

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (СТ)

(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюро



ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ! ВНИМАНИЕ!

(43) Дата международной публикации:
27 мая 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) Номер международной публикации:
WO 2004/043485 A1

(51) Международная патентная классификация ⁷:
A61K 38/43, 31/385, C12N 15/52, 9/02, A61P 39/06

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2003/000473

(22) Дата международной подачи:
5 ноября 2003 (05.11.2003)

(25) Язык подачи: русский

(26) Язык публикации: русский

(30) Данные о приоритете:
2002129774 10 ноября 2002 (10.11.2002) RU
2003123534 29 июля 2003 (29.07.2003) RU

(71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме (US): ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК [RU/RU]; 142290 Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, д. 3 (RU) [INSTITUTE OF CELL BIOPHYSICS RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES, Puschino (RU)].

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для (US): ФЕСЕНКО Евгений Евгеньевич [RU/RU]; 142290 Московская обл., Пушкино, м-р «В», д. 27, кв. 32 (RU) [FESENKO, Evgeny Evgenyevich, Puschino (RU)]; НОВОСЕЛОВ Владимир Иванович [RU/RU]; 142290 Московская обл., Пушкино, м-р

«Г», д. 27, кв. 15 (RU) [NOVOSELOV, Vladimir Ivanovich, Puschino (RU)]; ЯНИН Вадим Алексеевич [RU/RU]; 142290 Московская обл., Пушкино, м-р «Г», д. 28, кв. 88 (RU) [YANIN, Vadim Alekseevich, Puschino (RU)]; ЛИПКИН Валерий Михайлович [RU/RU]; 121359 Москва, ул. М. Тимошенко, д. 40, кв. 160 (RU) [LIPKIN, Valery Mikhaylovich, Moscow (RU)]; ШУВАЕВА Татьяна Маратовна [RU/RU]; 117457 Москва, ул. Профсоюзная, д. 1146, кв. 859 (RU) [SHUVAEVA, Tatyana Maratovna, Moscow (RU)].

(81) Указанные государства (национально): CA, JP, US.

(84) Указанные государства (регионально): европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

Опубликована

С отчетом о международном поиске.

До истечения срока для изменения формулы изобретения и с повторной публикацией в случае получения изменений.

В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и других сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям», публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюллетеня PCT.

(54) Title: ANTIOXIDANT PHARMACEUTICAL COMPOUND, METHOD FOR PRODUCING POLYPEPTIDE AND METHOD OF CURE

(54) Название изобретения: ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

(57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical compound for antioxidant protection of cells, tissues and n entire organism against hyperproduction of free radicals. The inventive compound comprises an effective quantity of at least one antioxidant in the form of a main acting component. Said antioxidant is selected from a group consisting of peroxiredoxine, a fragment thereof, dihydrolipoic acid and the combinations thereof with acceptable pharmaceutical additives. The inventive method for preventing and curing mammals consists in contacting the effective quantity of the compound with intercellular space of tissue, organ and entire mammal organism. Low toxicity of the compound makes it possible to increase the efficiency of treatment of multifactor actions on an organism, for example radiation, thermal, chemical burn, wounds and hurts as a result of disasters and fires.

[Продолжение на след. странице]

WO 2004/043485 A1

(57) Реферат: Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для антиоксидантной защиты клеток, тканей и организма в целом от гиперпродукции свободных радикалов, в состав которой в качестве основного действующего компонента входит эффективное количество, по крайней мере одного, антиоксиданта, выбираемого из группы состоящей из: пероксиредоксина, фрагмента пероксиредоксина, дигидролипоевой кислоты и их комбинации с фармацевтически приемлемыми добавками. Разработан способ профилактики или лечения млекопитающих, который основан на том, что, обеспечивают контакт эффективного количества композиции с межклеточным пространством ткани, органа или всего организма млекопитающего. Низкая токсичность композиции позволяет повысить эффективность лечения многофакторных воздействий на организм, например, радиации, термического, химического ожогов, ран, ушибов возникающих во время катастроф и пожаров.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ С АНТИОКСИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

- 5 Настоящее изобретение относится к области медицины, биотехнологии и генной инженерии и может быть использовано при получении антиоксидантного препарата пероксиредоксина и его фрагментов как компонентов фармацевтической композиции, предназначенной для профилактики и/или лечения патологий, которые частично или полностью вызваны нарушением баланса между окислительными и
- 10 восстановительными процессами в клетках и организмах млекопитающих.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

- Существующая в организме млекопитающих антиоксидантная система защиты является важным звеном, обеспечивающим динамическое постоянство состава клеток и жидкостных сред организма, включая кровь и лимфу. Антиокислительные
- 15 внутриклеточные ферментные системы противодействуют окислительному стрессу и обезвреживают активные формы кислорода. Важное место в этом отношении занимают органы дыхания, которые имеют эффективную эндогенную антиоксидантную защиту в респираторной системе (Bauer V. et al., 1999).

- Под воздействием окислительного стресса клетка утрачивает регуляторные
- 20 функции, что влияет на функциональные свойства ферментов, белков и рибонуклеиновых кислот и это, в конечном итоге, может привести к возникновению лавинообразных процессов гибели клеток.

- Баланс между формированием активных форм кислорода и эндогенной антиоксидантной защитой нарушается вследствие многих заболеваний или за счет
- 25 воздействия на организм эндогенных и/или экзогенных факторов. Нарушение баланса вызывается при: а) бактериальном или вирусном заражении, б) действии термических и/или химических факторов (ожог, отморожение), в) механических повреждений (раны, переломы, ушибы), г) при воздействии ионизирующей и неионизирующей радиации.

- 30 Разработка эффективных лекарств, которые способствуют профилактике или лечению заболеваний, сопровождаемых гиперпродукцией свободных радикалов, является важной задачей фармакологии.

- Обычно под термином “антиоксидант” понимают вещество, которое снижает
- 35 уровень или предотвращает образование активных радикалов или активных форм кислорода.

- 2 -

Известен широкий спектр заболеваний, при лечении которых, антиоксидантные препараты подтвердили свою эффективность (Babish J.G. et al. PCT Appl. WO0230419, 2002). К таким заболеваниям относятся: а) болезни легких, б) болезни печени, в) болезни почек, г) болезни кишечного тракта, д) болезни иммунной системы, е) болезни нервной системы, ж) болезни глаз, з) воспалительные процессы, и) болезни сердца, к) вирусные инфекции, например СПИД и другие.

Существует несколько подходов в поисках антиоксидантов, повышающих эффективность лечения или профилактики болезней вызываемых как экзогенными, так и эндогенными факторами.

10 Известно применение низкомолекулярных антиоксидантов, как гидрофильной, так и гидрофобной природы. К ним относятся α -токоферол, убихиноны, N-ацетилцистеин, глутатион (Gillissen A. et al., 1998; Kelly F.J., 1999; Tabot O. et al., US Pat. 6,187,743, 2001). Известно применение низкомолекулярных пептидов, которые имеют антиоксидантную активность (McLean et al., US Pat. 5,683,982, 15 1997). К общему недостатку использования низкомолекулярных антиоксидантов можно отнести то, что они обладают достаточно низкой антиоксидантной активностью и не эффективны при тяжелых патологиях.

Другой подход связан с применением антиоксидантов, обладающих высокой степенью антиоксидантной активности.

20 Известно применение тиоредоксина, который индуцирует синтез клеточного антиоксиданта MnSOD при лечении клеток эпителия легкого (White K. et al. US Pat. 5,985,261, 1999), или применение рекомбинантного SOD для профилактики болезней легких (Davis J.M. et al. 1993). К общему недостатку применения известных высокомолекулярных ферментов относится их узкий спектр действия.

25 Известны примеры комбинированного применения низкомолекулярных и высокомолекулярных антиоксидантов, например, для защиты клеток от действия свободных радикалов (Hellstrand, K. et al., 2001), или для лечения конкретных заболеваний, например, сосудов (Vita J.A. et al., 2001).

Следует отметить, что широко используемые антиоксиданты такие, как α -токоферол, каротиноиды, флавоноиды, пробукол в основном взаимодействуют с радикалами локализованными в гидрофобной зоне клеточных мембран и липопротеинов. В то же время, гиперпродукция свободных радикалов в первой фазе воспалительных заболеваний, локализуется в водной фазе, где наибольшей активностью обладают гидрофильные перехватчики активных форм кислорода.

30

- 3 -

В настоящее время открыт новый класс природных антиоксидантов, хорошо растворимых в воде, обладающих широким спектром антиоксидантной активности и исследованных в экспериментах *in vitro*. К такому классу относятся тиол-специфические антиоксиданты или пероксиредоксины, которые способны
5 нейтрализовать как органические, так и неорганические соединения в широком диапазоне их концентрации (Chae H.Z. et al., 1994; McGonigle S. et al., 1998). Из экспериментов *in vitro* известно, что многие из пероксиредоксинов участвуют в процессе пролиферации клеток (Prosperi M.T. et al., 1993; Pesenko I.V. et al., 1998; Novoselov S.V. et al., 1999).

10 Известны публикации, в которых изучалась роль пероксиредоксинов в клетках при дисфункциях вызванных: артеросклерозом (Butterfield L.H., 1999), раком (Chung Y.M. et al., 2001; Kinnula V.L. et al., 2002), нервными заболеваниями (Kim S.H. et al., 2001), болезнями легких (Das K.C. et al., 2001; Kim H.S. et al., 2002), болезнью почек (Fujii T., 2001), болезнью кожи (Lee S.C. et al., 2000), ионизирующей радиацией
15 (Park S.H. et al., 2000).

Отмечая важную роль синтеза пероксиредоксинов в клетках в ответ на оксидантный стресс, авторы публикаций предлагали повышать содержание разных типов пероксиредоксинов в самой клетке.

Известен способ лечения, основанный на повышении уровня пероксиредоксина в
20 клетке с помощью генной терапии. Для этой цели используют вектор, созданный генноинженерным способом, с помощью которого трансформируют клетки животных. В состав вектора введен ген, кодирующий последовательность пероксиредоксина, выделенного из гельминтов (Chandrashekar R. et al., US Patent 6,352,836, 2002). Одновременно с применением вектора авторы предлагают
25 дополнительно использовать белок в качестве средства для стимуляции иммунной системы животных. Следует отметить, что применение генотерапии для лечения млекопитающих не получило быстрого развития из-за дороговизны и выявления большого числа побочных эффектов.

Известны опыты по прямому применению натуральных пероксиредоксинов
30 PrxVI при лечении химических ожогов органов дыхания крыс (Novoselov V.I. et al., 2000). Недостатком такого способа являлась дороговизна получения натурального пероксиредоксина в препаративных количествах.

Известен способ для лечения СПИДа (HIV-1) (Lynn R. G., Walker B.D., PCT appl. WO02/077294, 2002), по которому, в качестве компонента лекарственного средства,

- 4 -

используют рекомбинантный пероксиредоксин. В качестве основного способа лечения предлагается применять систему очистки биологических образцов, таких как кровь, плазма, сыворотка, слюна и др. В системе очистки формируют контакт клеток, подверженных инфекции и входящих в состав биологического образца, с пероксиредоксином, концентрация которого составляет не менее 5µg/ml на время, которое требуется для ингибирования действия вирусных частиц и восстановления функций организма.

На основании гомологии аминокислотных последовательностей и иммунологического сродства все известные к настоящему времени пероксиредоксины млекопитающих могут быть классифицированы в следующие группы: P_{rx}I – P_{rx}IV, P_{rx}V и P_{rx}VI. Гомология белков, относящихся к одной и той же группе, составляет более 90%. Пероксиредоксины P_{rx}I – P_{rx}V принадлежат к группе 2-Cys тиол-специфических антиоксидантов. Группа P_{rx}V и P_{rx}VI, самая малочисленная, представлена 1-Cys пероксиредоксинами, сильно отличается от других групп и имеет только 20-40% общих аминокислотных последовательностей с пероксиредоксинами других групп.

Семейство пероксиредоксинов отличается высокой консервативностью и его представители обнаружены в геномах практически всех живых организмов от бактерий до человека. Согласно данным иммуно-гистохимических исследований, полученных с помощью световой микроскопии и *in situ* гибридизации, пероксиредоксин P_{rx}VI обнаруживается практически во всех тканях животного. Однако его максимальная концентрация выявлена преимущественно в тканях непосредственно контактирующих с атмосферой, а именно: в обонятельном эпителии, трахее, бронхах легких, эпидермисе кожи и волосяных фолликулах (Novoselov S.V et al., 1999). Иммуно-гистохимические исследования с помощью электронной микроскопии показали, что P_{rx}VI является единственным идентифицированным к настоящему времени секреторным пероксиредоксином. Он синтезируется в специализированных клетках (бокаловидные клетки респираторного эпителия и опорные клетки обонятельного эпителия) и секретируется в слизь, покрывающей клетки этих эпителиальных тканей. Прямые биохимическими и иммунологическими исследованиями на крысе было показано, что в трахее, бронхах легких и обонятельном эпителии вклад P_{rx}VI в нейтрализацию активных форм кислорода составляет 70-80%. Аналогичные

результаты были получены для трахеи и бронхов человека. Например, в составе слизи эпителия трахеи концентрация PrxVI составляет не менее 15мкг в 1мг белка.

Известны способы получения натурального пероксиредоксина (Pesenko I.V. et al., 1998, Novoselov S.V et al., 1999). Эти способы включают в себя выделение ткани из органов млекопитающих, ее накопление и гомогенизацию, экстракцию целевого белка, а также тонкое фракционирование препарата с помощью трёх последовательных хроматографических стадий. Основными недостатками получения PrxVI из природных источников являются: необходимость накопления животных тканей, малый конечный выход чистого препарата (0,01 мг на одно животное) и возможность возникновения 5 аллергических реакций при использовании чужеродного белка для лечения человека.

Рекомбинантный белок PrxVI можно получить, используя различные экспрессионные системы (Sang W. K. et al., 1998; Chen J.W. et al., 2000; Peshenko I.V. et al., 2001).

Известно получение рекомбинантного белка PrxVI в прокариотических клетках штамма *E. coli* BL21 (Chen J.W., 2000). Для этого был взят фрагмент кДНК PrxVI_{hum} HA0683 (GenBank™ D14662) длиной 1653 п.о., содержащий открытую рамку считывания для PrxVI_{hum}. Большая часть исходного фрагмента (длиной 1044 п.о.) была встроена в экспрессирующий вектор pET28c по сайту рестрикции *Hind*III. Полученная конструкция обеспечивала наработку рекомбинантного белка, который, наряду с 20 аминокислотной последовательностью PrxVI_{hum}, содержал 42 дополнительных аминокислотных остатка, включая шесть остатков His на N-конце полипептидной цепи белка. Взяв за основу тот же фрагмент PrxVI_{hum} и искусственно введя сайты для узнавания рестриктаз *Nde*I и *Xho*I, авторы амплифицировали кодирующую область. Полученный фрагмент был клонирован по этим сайтам в экспрессирующий вектор 25 pET21b. В результате, рекомбинантный белок, биосинтез которого детерминировала эта плазмида, содержал два дополнительных аминокислотных остатка, помимо шести остатков His на полипептидной цепи продукта. После трансформации *E. coli* полученными рекомбинантными ДНК и индукции экспрессии генов изопропилтиогалактозидом (ИПТГ) клетки наращивали в течение 6 ч и разрушали.

30 Белковые препараты подвергали последовательной очистке хроматографическими методами. Хотя введение в состав полипептидной цепи дополнительных остатков His значительно упрощает выделение рекомбинантных белков, такого рода модификации заметно смещают изоэлектрическую точку белковых продуктов по сравнению с

- 6 -

природными белками и, как следствие, меняют их электростатическое микроокружение.

Известна экспрессия рекомбинантного PrxVI в эукариотических клетках (Fujii T. et al., 2001). Для этого из различных тканей крысы была выделена смесь мРНК, по которой обратной полимеразной реакцией синтезировали комплементарную цепь ДНК. Затем эту кДНК субклонировали в бакуловирусный челночный вектор pVL1392. Полученная конструкция обеспечивала наработку полноразмерного PrxVI крысы при инфекции эукариотических клеток Sf21. К недостаткам этого метода можно отнести длительность получения препарата, необходимость использования дорогостоящих питательных сред, невысокий по сравнению с бактериальными системами выход целевого продукта и возможность возникновения побочных аллергических реакций при использовании в лекарственных композициях крысиного PrxVI.

Известно, что в качестве компонента лекарственного средства было предложено использовать фрагменты белка пероксиредоксина или его модификации, включая белки с заменами и делециями в аминокислотной последовательности для лечения СПИДа (Lynn R. G., Walker B.D., PCT appl. WO02/077294, 2002). Эти предположения не подтверждены примерами функциональной активности выбранных фрагментов белков для лечения других типов заболеваний, кроме вирусных. Кроме того, выбранные фрагменты относятся к применению консервативных участков последовательности 2-Cys пероксиредоксинов, располагаемых в областях N и C концов последовательности, что не является предметом рассмотрения данного изобретения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для антиоксидантной защиты клеток, тканей и организма в целом от гиперпродукции свободных радикалов, в состав которой в качестве основного действующего компонента входит эффективное количество, по крайней мере одного, антиоксиданта, выбираемого из группы состоящей из: i) пероксиредоксина, ii) фрагмента пероксиредоксина, iii) дигидролипоевой кислоты, iv) комбинации по пунктам: i) и ii), i) и iii), ii) и iii), i) и ii) и iii) и фармацевтически приемлемые добавки. В фармацевтическую композицию могут входить пероксиредоксины выбираемые из группы состоящей из: PrxI, PrxII, PrxIII, PrxIV, PrxV и PrxVI. отдельно или совместно с терапевтическим агентом. Терапевтический агент выбирают из группы: i) антибактериальных, противовирусных, антигрибных, антигистаминных препаратов,

- 7 -

ii) высокомолекулярных ферментов, которые обеспечивают дополнительную защиту от свободных радикалов, iii) низкомолекулярных соединений, обеспечивающих дополнительное снижение уровня свободных радикалов внутри клетки, iv) препаратов используемых для трансплантации или криоконсервации
5 органов, v) биологически активных белков, vi) гормонов, vii) витаминов.

Другим объектом изобретения является способ повышения антиоксидантной защиты клеток, тканей и организма млекопитающих, по которому обеспечивают контакт эффективного количества пероксиредоксина и/или его фрагмента
10 входящих в фармацевтическую композицию с межклеточным пространством. Контакт с межклеточным пространством ткани, органа или организма в целом осуществляют либо посредством пассивной или активной диффузии с помощью аппликаций, капель, распыления, сублингвального, вагинального, или ректального
15 ввода, либо за счет доставки с помощью парентрального или эндолумбального введения путем инъекций. Антиоксидантную защиту от экзогенных и/или эндогенных факторов, вызывающих патологию, осуществляют предварительно и/или в процессе развития патологии и/или в течение восстановительного периода.

Следующим объектом изобретения является способ продуцирования натурального человеческого белка пероксиредоксина PrxVI_{hum} или N- концевой
фрагмента пероксиредоксина Δ PrxVI_{hum}, имеющего аналогичную антиоксидантную
20 эффективность, но меньший размер и более высокую проницаемость в межклеточном пространстве. В соответствии со способом осуществляют выбор фрагмента молекулы нуклеиновой кислоты для кодирования белка, создают экспрессирующий вектор для трансформации клеток, проводят трансформацию
клеток, осуществляют культивирование клеток в условиях, обеспечивающих
25 продуцирование указанного белка и/или его фрагмента, проводят последующее выделение белка из клеточной культуры.

К другому объекту изобретения, относится молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, обладающий антиоксидантными свойствами. Молекула
нуклеиновой кислоты представляет собой ДНК или РНК, и включает нуклеотидную
30 последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности натурального человеческого белка пероксиредоксина PrxVI_{hum} (SEQ ID NO: 1) длиной 224 а.о. или N- концевой фрагмент ДНК пероксиредоксина Δ PrxVI_{hum} (SEQ ID NO: 2) длиной 177 а.о. или N- концевой фрагмент ДНК пероксиредоксина Δ PrxVI_{hum} длину которого выбирают в пределах от 178 а.о. по 223 а.о. включительно.

- 8 -

Следующим объектом изобретения является рекомбинантная плазмида для продуцирования натурального человеческого белка пероксиредоксина PrxV1hum или фрагмента пероксиредоксина ΔPrxV1hum, содержащая под контролем промотора фага T7 открытую рамку считывания, включающую в себя

5 инициаторный ATG-кодон, кДНК пероксиредоксина человека или кДНК фрагмента пероксиредоксина и стоп кодон обеспечивающие ее экспрессию в совместимой клетке-хозяине.

К другому объекту изобретения относится штамм или линия клеток, которые создают путем трансформации клеток вектором, являющимся продуцентом

10 натурального человеческого белка пероксиредоксина PrxV1hum или фрагмента пероксиредоксина ΔPrxV1hum. Клетки выбирают из группы состоящей из прокариотов или эукариотов.

ПЕРЕЧЕНЬ ФИГУР

Настоящее изобретение иллюстрируется фиг.1– фиг.11.

15 Фиг. 1. Физическая карта плазмиды pET23-a-PrxV1hum. В верхней части – расположение кДНК пероксиредоксина PrxV1hum и уникальных сайтов рестрикции в полилинкере;

Фиг. 2. Физическая карта плазмиды pET23-a(+) ΔPrxV1hum. Указаны сайты эндонуклеаз рестрикции. Ori- участок инициации репликации плазмиды. AP –

20 генетический маркер, детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой pET23-a(+)ΔPrxV1hum клеток *E. coli* к ампицилину;

Фиг. 3. Сравнение протекторных свойств натурального крысиного PrxV1rat (поз. 1), рекомбинантного PrxV1hum (поз.2) и его N-концевого фрагмента ΔPrxV1hum (поз.3) по защите глутаминсинтетазы *E.coli* от инактивации в модельной окислительной системе

25 *in vitro*.

Фиг.4. Включение ³H-тимидина в стимулированные конканавалином А лимфоциты мыши в присутствии PrxV1hum. Где: 1 – среда, 2 – Т-клетки без стимуляции конканавалином А, 3 – Т-клетки, стимулированные конканавалином А, 4 – Т – клетки в присутствии PrxV1hum, 5 – Т-клетки стимулированные

30 конканавалином А в присутствии PrxV1hum.

Фиг.5. Внешний вид крыс через 12 месяцев после гамма-облучения (600 рентген). Где: А – контроль; В – крыса с введенным перед облучением рекомбинантным PrxV1hum.

- 9 -

Фиг.6. Эпителий трахеи крысы после ожога парами соляной кислоты и последующей аппликации натурального крысиного или рекомбинантного PrxVHum. Аппликация проводилась через 1 час после ожога. Где: А – контроль; В – эпителий через сутки после химического ожога; С – эпителий через сутки после химического ожога с аппликацией PrxVHum через час после ожога; Е – эпителий трахеи; ВМ – базальная мембрана. Наблюдается практически полное сохранение всех клеток эпителия

Фиг.7. Восстановленный клеточный эпителий трахеи крысы через 14 суток после ожога парами соляной кислоты. Где: А – контроль; В – эпителий через 14 суток после химического ожога; С – эпителий через 14 суток после химического ожога с аппликацией PrxVHum, Е – эпителий трахеи; ВМ – базальная мембрана, F – фагоциты. Терапию проводили через сутки после ожога в течение 5 дней. Аппликацию раствора фармацевтической композиции на основе рекомбинантного PrxVHum проводили один раз в сутки.

Фиг.8. Эпителий трахеи крысы после аппликации липополисахарида. Где: А – норма; В – через час после аппликации; С – через 3 часа после аппликации; Е – эпителий трахеи; ВМ – базальная мембрана; F – фагоциты. Наблюдается значительная гибель клеток эпителия и появление большого количества фагоцитирующих клеток.

Фиг.9. Эпителий трахеи крысы после аппликации в нее липополисахарида и последующей аппликации рекомбинантного PrxVHum. Где: А – контроль без применения PrxVHum; В – результат применения PrxVHum после аппликации липосахарида; Е – эпителий трахеи; ВМ – базальная мембрана; F – фагоциты. Аппликация PrxVHum проводилась сразу после аппликации липополисахарида.

Фиг.10. Применение пероксиредоксина PrxVHum или его фрагмента Δ PrxVHum для лечения ран. Где: А – для лечения использован бактерицидный пластырь, В – проведена аппликация PrxVHum на рану, С – проведена аппликация Δ PrxVHum на рану.

Фиг. 11. Сравнительные характеристики антиоксидантных свойств дитиотреитола-1, липоевой кислоты-2 и дегидролипоевой кислоты-3. Антиоксидантная активность определялась по степени защиты глутаминсинтетазы против металл-катализируемой окислительной системы. Антиоксидантная эффективность тиолов определялась в молярной концентрации, при которой происходила 50% защита глутаминсинтетазы.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам лечения или предотвращения заболеваний вызванных нарушением баланса между окислительными и восстановительными процессами в клетках и организмах млекопитающих с помощью фармацевтических композиций в состав которых в качестве основного действующего компонента входит, по крайней мере, один антиоксидант выбираемый из группы состоящей из: i) пероксиредоксина, ii) фрагмента пероксиредоксина, iii) дигидролипоевой кислоты, iv) комбинации по пунктам: i) и ii), i) и iii), ii) и iii), i) и ii) и iii). В фармацевтическую композицию могут входить пероксиредоксины выбираемые из группы состоящей из: PrxI, PrxII, PrxIII, PrxIV, PrxV и PrxVI.

В качестве примера, который подтверждает, но не ограничивает сущность настоящего изобретения, приводится способ получения пероксиредоксина человека PrxVIhum ген, которого выделен из клеток миелобласта (Nagase T. et al., 1995, EMB/GenBank D1 4662, HA0683). Размер фрагмента ДНК PrxVIhum пероксиредоксина (SEQ ID NO: 1) составляет 672 п.о. Длина нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, составляет 224 аминокислотных основания. В примере 2 рассмотрен вариант конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pET23-a-PrxVIhum, кодирующей полноразмерный пероксиредоксин PrxVIhum.

Другой пример, который подтверждает, но не ограничивает изобретение, относится к способу получения, по крайней мере, одного типа фрагмента пероксиредоксина человека ΔPrxVIhum, который относится к N-концевому фрагменту нуклеиновой кислоты, длину которого выбирают в пределах от 177 до 224 а.о. В примере 3 рассмотрен вариант конструирования рекомбинантной плазмидной ДНК pET23-a(+) ΔPrxVIhum, кодирующей N-концевой фрагмент пероксиредоксина человека ΔPrxVIhum (SEQ ID NO: 2) длиной 177 а.о. с молекулярной массой 19691,61 Да, содержащая *EcoRI-NdeI* – фрагмент плазмиды pET23-a(+), включающий промотор РНК-ролимеразы фага T7, участок инициации репликации (*ori*), генетический маркер (*Ap*), детерминирующий устойчивость трансформированных плазмидой pET23-a(+) ΔPrxVIhum клеток *E. coli* к ампициллину, уникальные сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами со следующими координатами: *NdeI*-790, *EcoRI*-192, *PvuII*-1531 и *NdeI-EcoRI* - фрагмент длиной 552 п.о. с последовательностью ΔPrxVIhum. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET23-a(+) ΔPrxVIhum имеет размер 4210 п.о. Преимущества предложенной конструкции достигаются за счёт того, что входящий в ее состав фрагмент ΔPrxVIhum, кодирует укороченный по сравнению с

PrxV^{Hum} полипептид, сохраняющий антиоксидантную активность природного белка. Это, во-первых, упрощает хроматографическую очистку Δ PrxV^{Hum}; во-вторых, делает более технологичным его использование в составе лечебных композиций за счет лучшей проницаемости в ткани; в-третьих, увеличивает долю целевого продукта в общей биомассе штамма-продуцента, что, в свою очередь, ведет к снижению себестоимости конечного продукта.

В рамках настоящего изобретения в примере 4 рассматривается способ получения функционально активного полноразмерного рекомбинантного пероксиредоксина PrxV^{Hum} или его N- концевой фрагмента Δ PrxV^{Hum}, который включает культивирование штамма или линии клеток, трансформированных плазмидой в условиях, обеспечивающих продуцирование указанного белка или его фрагмента и последующее выделение рекомбинантного белка из клеточной культуры. Клетки, входящие в штамм или в линию клеток выбирают из группы состоящей из прокариотов, например бактериальной культуры E coli, или эукариотов, например клеток дрожжей, клеток растений, клеток животных или клеток насекомых.

Синтезированный по разработанному способу рекомбинантный PrxV^{Hum} имеет антиоксидантные характеристики, близкие характеристикам PrxV^{Irat}, который выделен из обонятельного эпителия крысы.

Как натуральный PrxV^{Irat}, так и рекомбинантный PrxV^{Hum} пероксиредоксины не оказывали никакого влияния на количество живых клеток линии L929, а уровень пролиферации Т-лимфоцитов стимулированных конканавалином А увеличивался примерно в 2 раза по сравнению с уровнем пролиферации клеток стимулированных только конканавалином А (см пример 7). Таким образом, можно сделать вывод о том, что тестируемые соединения являются малотоксичными.

Показана эффективность распределения пероксиредоксина в различных тканях организма после внутривенного введения композиции, в состав которой включают рекомбинантный PrxV^{Hum}, меченый флуоресценизотиоцианатом (см. пример 9). Через 15 минут после инъекции в вену крысы композиции с пероксиредоксином PrxV^{Hum}, последний равномерно распределяется по всем органам крысы, включая мозг. Таким образом, способ внутривенного введения рекомбинантного PrxV^{Hum} позволяет повысить его содержание практически во всех тканях организма.

Многофункциональность применения пероксиредоксина, как эффективного антиоксиданта, подтверждена примерами лечения заболеваний млекопитающих

- 12 -

вызванных как экзогенными, так и эндогенными факторами, входящими в группу: а) ионизирующей радиации, б) химического ожога, в) острого воспалительного процесса, г) раны. Приведенные примеры включают, но не ограничивают других применений пероксиредоксина для профилактики и/или лечения.

- 5 Пероксиредоксин типа PrxV_{Hum} входит, но не ограничивает, перечень пероксиредоксинов, которые обладают высокой антиоксидантной активностью и могут быть использованы для создания лекарственных препаратов.

РАДИОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПЕРОКСИРЕДОКСИНОВ

- Исследование радиопротекторных свойств PrxV_{Hum} проводят как *in vitro*,
 10 исследуя раствор гемоглобина, так и *in vivo* на животных. Облучение раствора гемоглобина (см. пример 10) приводит к существенным изменениям в его структуре (появление пиков при 635 нм и повышение светорассеивания), что свидетельствует о превращении оксигемоглобина в метгемоглобин с последующей его агрегацией. Добавление PrxV_{Hum} в раствор гемоглобина в концентрации около
 15 50 мкг/мл до облучения приводит к значительному снижению образования окисленных форм гемоглобина, концентрация которых снижалась практически до нуля.

- Радиопротекторные свойства пероксиредоксина в экспериментах *in vivo* определяют на примере защиты животных от действия гамма-облучения в
 20 сублетальной дозе с интенсивностью 6 Гр. Данные, подтверждающие радиопротекторные свойства пероксиредоксина PrxVI, приведены в таблице 1 и примере 13. Прямая однократная инъекция рекомбинантного PrxV_{Hum} в вену за 30 минут до облучения позволила резко увеличить число выживших животных по сравнению с контролем и уменьшить количество возникающих от облучения
 25 злокачественных образований.

Таблица 1. Выживаемость крыс при введении до облучения PrxV_{Hum}. Группы по шесть крыс одновременно подвергались гамма-облучению при дозе 6 Гр. В таблице указано число выживших крыс в каждой группе в указанное время

30

	3 месяца	6 месяцев	12 месяцев	15 месяцев
Контроль	4	3	2	1
PrxV _{Hum}	6	5	4	4

Пероксиредоксин как радиопротектор, можно использовать в качестве компонента фармацевтических композиций для профилактики или лечения широкого спектра заболеваний. Эти заболевания могут быть вызваны: а) ионизирующей радиацией (в первую очередь при радиотерапии, профилактических исследованиях, при работе персонала с источниками радиации), б) космической радиацией, влияющей в первую очередь на космонавтов и пилотов, в) радионуклеотидным заражением из-за приема зараженной радионуклеотидами пищи, воды или воздуха, г) воздействием неионизирующей радиации, например, при томографическом исследовании, д) воздействием на организм источников ультрафиолетового излучения (солнечный свет, сварка, импульсные источники света, дисплеи). Для предотвращения или снижения действия гиперпродукции свободных радикалов возможно применение антидотов с введенными в них пероксиредоксинами. Состав антидотов должен быть ориентирован на тот тип экзогенного воздействия, который существует в зоне, в которой необходимо осуществлять работы по ремонту оборудования, или устранения аварий, или устранения последствий катастроф.

ЛЕЧЕНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ВЫЗВАННЫХ ЭКЗОГЕННЫМИ ФАКТОРАМИ

В качестве примера экзогенного фактора был выбран химический ожог, действие которого было смоделировано в соответствии с примером 14. Для разработки более эффективного способа лечения исследовали этапы развития патологии после воздействия ожога.

На первом этапе исследовали динамику изменения уровня нейтрофилов и ферментов-антиоксидантов в клеточном эпителии трахеи крыс после ожога парами соляной кислоты. Наблюдала два периода резкого возрастания количества активных нейтрофилов: через 40 минут и 6 часов после ожога. Резкое повышение количества активных нейтрофилов усугубляет степень поражения, так как происходит выброс перекиси водорода нейтрофилами.

Биохимические исследования (см. пример 9) показали, что уровень активности пероксиредоксина P_{rx}VI_{rat} в клетках эпителия увеличивается примерно в два раза сразу после ожога. В тоже время активность супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, которые являются основными ферментами-антиоксидантами организма, уменьшается в слизи трахеи примерно на 30%. Через

- 14 -

сутки наблюдали снижение уровня активности всех перечисленных ферментов, в том числе и PrxVI_{rat} пероксиредоксина.

Гистохимические исследования показали, что через 40 минут после ожога в эпителии трахеи и бронхах начинаются процессы гибели клеток цилиарного эпителия, которые в последующее время носят лавинообразный характер. Максимум гибели клеток эпителия слизистой верхних дыхательных путей наблюдается через сутки после ожога. При этом происходит практически полная гибель клеток мерцательного эпителия, осуществляющего мукоцилиарный транспорт в трахее и бронхах. Это состояние эпителия было принято в качестве контроля для сравнительной оценки степени ожога и эффективности проводимого лечения.

Воспалительный процесс, вызванный химическим ожогом, характеризуется двумя периодами развития патологии после химического ожога: первый (до 24 часов после ожога) – период развития поражения эпителия, второй (после первых суток после ожога) – период очень медленного восстановления эпителия. Без лечения частичное восстановление эпителия слизистой трахеи после химического ожога наблюдается через 30 дней.

В качестве одного из вариантов лечения млекопитающих после химического ожога верхних дыхательных путей, который включает, но не ограничивает других способов доставки лекарственного средства к месту поражения, был использован вариант аппликации верхних дыхательных путей крысы раствором, в состав которого входит пероксиредоксин PrxVI_{hum}. На фиг. 7 показан срез эпителия трахеи крысы через 14 суток после ожога при ежедневной 5-ти кратной аппликации PrxVI_{hum}. Наблюдается практически полностью сохранный эпителий слизистой трахеи, что свидетельствует о практически полной регенерации мерцательных клеток эпителия. Присутствие элементов слизистого секрета, в котором определяются фагоциты, свидетельствует о наличии остаточного воспалительного процесса в трахее.

ЛЕЧЕНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ВЫЗВАННЫХ ЭНДОГЕННЫМИ ФАКТОРАМИ

В качестве другой модели воспаления исследован воспалительный процесс в респираторном эпителии, вызванный токсинами бактериальной природы – липополисахаридами (ЛПС), который является составной частью внешней стенки мембраны большинства грамм-отрицательных бактерий (см. пример 15).

После аппликации липополисахарида, вызывающего острую воспалительную реакцию в трахее млекопитающего, исследовали динамику изменения уровня нейтрофилов, TNF- α и пероксиредоксина PrxVIrat в клеточном эпителии трахеи крыс. Для определения характеристик способа лечения проводили исследование динамики уровня нейтрофилов и антиоксидантов, а также биохимические и гистохимические исследования воздействия воспалительного процесса на организм млекопитающего.

Наблюдали резкое возрастание количества активных нейтрофилов через час после введения ЛПС. Резкое повышение количества активных нейтрофилов в свою очередь усугубляет степень поражения, так как происходит выброс H_2O_2 нейтрофилами.

Биохимические исследования показали, что уровень активности пероксиредоксина PrxVIrat в клетках эпителия увеличивается примерно в два раза через час после аппликации липополисахарида.

Из данных гистологических исследований видно, что в случае применения концентрации ЛПС равной 10^{-7} мг/животное, наблюдается массивное накопление нейтрофилов в стенке трахеи, развитие отека с последующим отслоением слизи в просвет трахеи и гибелью клеток через 3 часа. (см. пример 15, фиг.8).

Иммуно-гистохимические исследования показали, что во многих областях эпителия трахеи уже через час наблюдается массовая гибель клеток, секретирующих пероксиредоксин PrxVIrat, что приводило к отсутствию PrxVIrat в слизи, покрывающей данные области трахеи. Это состояние эпителия было принято в качестве контроля для сравнительной оценки степени воспалительной реакции и эффективности проводимого лечения.

Прямая однократная аппликация рекомбинантного PrxVIhum в трахею крысы сразу после аппликации липополисахарида приводила практически к полному восстановлению эпителиальной ткани через 2 недели (см фиг 9), в то время как у животных контрольной группы, не получивших лечения после аппликации ЛПС, мерцательный эпителий практически не восстановился.

Введение PrxVIhum в область поражения эпителиальных клеток предупреждает развитие вторичных альтеративных нарушений, тем самым ограничивая объем патологических изменений. Нейтрализация активных форм кислорода восстанавливает пролиферативные клеточные процессы, способствует быстрой

регенерации поврежденного эпителия, уменьшает риск развития инфекционных осложнений в очаге поражения.

Применение других антиоксидантов, например глутатиона, не дало значительного эффекта (см. таблицу 1).

- 5 Таблица 1. Сохранность эпителия трахеи при аппликации различных антиоксидантов после поражения эпителия трахеи (согласно гистологическим данным).

10	Время после воздействия LPS		Глутатион	PrxV1hum
	1 час	30	30%	90%
	3 часа	20	20%	80%
	6 часов	10	10%	65%
15	Лечение через сутки в течение 5 дней и сохранность эпителия через 2 недели	20	20%	80%

20

ЛЕЧЕНИЕ РАН

При лечении ран (см. пример 16) , возможно использовать разные способы введения композиции, содержащей 0,5 мг/мл пероксиредоксина PrxV1hum и/или 1,5 мг/мл его фрагмента ΔPrxV1hum, в межклеточное пространство области поражения.

- 25 Тем не менее, даже обычное нанесение композиции тонким слоем и/или аппликация на место поражения и пассивная диффузия молекул PrxV1hum и/или ΔPrxV1hum в межклеточное пространство, приводит к более быстрому и полному заживлению раны. Характерной особенностью ран при применении пероксиредоксинов было то, что процесс заживления раны не входил в длительную воспалительную фазу,
- 30 причиной которой, по литературным данным, является инфекция. Аппликация пероксиредоксина способствовала ускорению фагоцитирования инфекции нейтрофилами и макрофагами в ране и, тем самым, являлась причиной ускорения заживления ран. Проведенные гистологические исследования показали, что при аппликации обоих пероксиредоксинов на рану рубец был значительно меньше чем
- 35 при применении бактерицидного пластыря. Сравнение клеточного состава рубца

через 8 суток после хирургического надреза показало, что аппликация обоих пероксиредоксинов значительно уменьшала число нейтрофилов, макрофагов, тромбоцитов, лимфоцитов и эритроцитов, которые характерны для воспалительной фазы регенерации ран. Кроме того, число молодых фибробластов в рубце при
5 аппликации пероксиредоксинов было значительно меньше. На фиг. 10 представлен эффект аппликации пероксиредоксина или его фрагмента на рану по сравнению с лечением раны бактериальным пластырем.

СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ИЛИ ЛЕЧЕНИЕ БОЛЕЗНИ ВЫЗВАННОЙ ГИПЕРПРОДУКЦИЕЙ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ

10 В процессе экспериментов по моделированию экзогенных и эндогенных воздействий на организм животных, обнаружен факт того, что, введение в жидкостную среду организма (включая кровь и лимфу) и/или межклеточное пространство, тканей, органов или организма в целом фармацевтической композиции, в состав которой входит, по крайней мере один, тип пероксиредоксина
15 приводит к высокой эффективности профилактики и/или лечения большой группы заболеваний которым сопутствует гиперпродукция свободных радикалов.

В общем случае, способ лечения болезни, при которых полезно компенсировать гиперпродукцию свободных радикалов в тканях или органах или во всем организме млекопитающих, заключается в введении в межклеточное пространство клеток,
20 тканей и организма в целом фармацевтической композиции, в состав которой в качестве основного действующего компонента входит эффективное количество, по крайней мере одного, антиоксиданта, выбираемого из группы состоящей из: i) пероксиредоксина, ii) фрагмента пероксиредоксина, iii) дигидролипоевой кислоты, iv) комбинации по пунктам: i) и ii), i) и iii), ii) и iii), i) и ii) и iii) и фармацевтически
25 приемлемые добавки. В фармацевтическую композицию могут входить пероксиредоксины выбираемые из группы состоящей из: PrxI, PrxII, PrxIII, PrxIV, PrxV и PrxVI. отдельно или совместно с терапевтическим агентом. Причем введение композиции в межклеточное пространство тканей, органов или в организм млекопитающего в целом, осуществляют путем аппликации, инъекции или других
30 способов известных в медицинской практике применения биологически активных пептидов.

Предлагаемый способ относится к разным вариантам профилактики или лечения тканей, органов или всего организма млекопитающих в целом включая:

А) профилактическую защиту организма, отдельных органов и отдельных зон нормальной ткани от гиперпродукции свободных радикалов вызываемой: i) ионизирующей радиацией, например при проведении лечения рака, или при полетах на больших высотах и в космическом пространстве, ii) действием термического и/или химического ожогов при ликвидации катастроф и пожаров, iii) комбинацией факторов по п. i), ii).

Б) защиту тканей, органов и организма млекопитающих, в которых за счет эндогенных или экзогенных факторов идет воспалительный и/или иммунный процесс, связанный с гиперпродукцией свободных радикалов, что сопутствует или вносит основной вклад в процесс болезней легких, печени, почек, желудочно-кишечного тракта, иммунной системы, нервной системы, болезни глаз, воспалительных процессов, вызванных бактериальной или вирусной инфекциями, или защиту клеток организма при предотвращении последствий химиотерапии при лечении рака, лейкоза, СПИДА, или защиту от действия озона или других экзогенных факторов.

В) защиту органов, предназначенных для трансплантации или для улучшения возможности криоконсервации.

Д) защиту органов от воспалительных процессов, вызванных механическими повреждениями кожи и ткани в результате травм, инъекций лекарственных препаратов или хирургических операций.

В зависимости от вида терапии или профилактики определяют длительность применения и дозовые характеристики лекарственных препаратов содержащих пероксиредоксины. В процессе симптоматической терапии, вызванной кашлем или зудом, достаточно применение одноразовых доз. Патогенетическая терапия, направленная на подавление механизмов болезни, требует применения препаратов подавляющих гиперпродукцию радикалов в процессе лечения болезни. Когда окислительно-восстановительный баланс в организме млекопитающего нарушен из-за болезни конкретного органа, требуется заместительная терапия и лечение требует доз антиоксидантов – пероксиредоксинов достаточных для компенсации и восстановления функций органа. В процессе этиотропной терапии, ввод лекарств содержащих пероксиредоксин, например, через капельницу, осуществляют в течение периода вывода из организма ядов или других экзогенных веществ. Наиболее предпочтительно применение композиций и лекарств, содержащих пероксиредоксин, для проведения комплексных терапий. В последнее время, в связи

с широким распространением сердечно-сосудистых заболеваний, иммунной системы, лечением СПИД, алкогольной и наркологической зависимости препараты на основе пероксиредоксина можно использовать в поддерживающей терапии, наряду с другими препаратами длительного применения.

- 5 На основании исследования состояния ткани, органа или всего организма в целом определяют процедуру лечения, выбираемую из группы: а) однократной или многократной аппликации или распыления раствора фармацевтической композиции или лекарства на пораженный участок, б) однократных или многократных инъекций раствора фармацевтической композиции или лекарства, в) однократного или
- 10 многократного приема таблетированных, порошковых или жидких форм сублингвально, или в виде присыпок, паст, свечей, мазей, гелей для нанесения на поверхность кожи и эпителия, или за счет комбинации указанных способов.

- Перенос активного компонента пероксиредоксина в межклеточное пространство ткани, органа или организма в целом осуществляют либо посредством пассивной
- 15 или активной диффузии при аппликациях или распылении, либо за счет переноса PrxVlhum или $\Delta\text{PrxVlhum}$ или их комбинации с активатором через кровь или в комбинации с компонентами крови (плазма, сыворотка) или в комбинации с заместителями крови (например, перфтораном) или через лимфу.

- Ввод композиции в межклеточное пространство ткани, органа или организма
- 20 может быть осуществлен различными способами. Поскольку пероксиредоксин подвержен расщеплению и потере биологической активности при прохождении через желудочно-кишечный тракт, основным способом введения является парентральный метод. При парентральном введении используют инъекции, инфузии, ингаляций, введение в дренаж. Раствор для инъекций вводят
- 25 внутримышечно, внутривенно ударными дозами или длительными инфузиями, внутриартериально; интратекально, интравентрикулярно, эндолумбально. Возможно использовать раствор, порошок или таблетированные формы сублингвально. В ряде случаев требуется вагинальный и ректальный ввод препаратов. Возможно введение композиции с помощью капель в нос или глаз, или
- 30 с помощью промывания или клизм.

Способы доставки композиции к месту воспаления эпителиальных тканей, приведенные в данном описании, не ограничивают применения других известных способов доставки биологически активных полипептидов к месту воспаления или поражения.

Предпочтительно перед началом лечения воспалительных процессов исследовать уровень нейтрофилов и/или концентрацию антиоксидантов в пораженных тканях или организме. С этой целью используют процедуру определения концентрации пероксиредоксина в биологических пробах с помощью поликлональных кроличьих антител против рекомбинантного пероксиредоксина (см пример 11). На основании полученных данных выбирают процедуру лечения, выбираемую из группы однократного или многократного контакта композиции с зоной воспаления ткани или органа и периоды нанесения композиции.

Исходя из тяжести воспалительного процесса, определяют минимально-эффективное количество фармацевтической композиции и проводят лечение.

Например, при лечении воспалительных процессов верхних дыхательных путей, композицию, содержащую пероксиредоксин, вводят в нос и/или в трахею и/или в бронхи легкого. Для аппликации используют или раствор композиции, или предварительно раствор распыляют, превращая его в воздушно-капельную смесь, или применяют композицию, выполненную в виде сухого мелкодисперсионного порошка, или используют композицию, которая иммобилизована в мелкодисперсные гранулы или наночастицы диаметром от 0.1 nm до 7000 nm (например, Esenaliev, 2000), или композицию иммобилизуют в липосомы (например, Thibeault D.W. et al., 1991).

При лечении поражений кожи композицию наносят тонким слоем и/или делают аппликацию на место поражения. Способы доставки композиции к месту воспаления эпителиальных тканей, приведенные в данном описании, не ограничивают применения других известных способов доставки биологически активных полипептидов к месту воспаления или поражения.

При профилактике или лечении заболеваний, связанных с ионизирующим или неионизирующим воздействием, концентрацию, по крайней мере, одного типа пероксиредоксина, выбирают в зависимости от интенсивности ионизирующего или неионизирующего воздействия, учитывая параметры млекопитающего (его вес, возраст, состояние организма). В процессе лечения или профилактики выбранный состав композиции вводят однократно или многократно до воздействия, во время воздействия или после воздействия организма с радиацией или неионизирующим излучением.

При профилактике и/или лечении гиперпродукции свободных радикалов, вызываемой одновременным действием ионизирующей радиации и/или

термического и/или химического ожога и/или заражения организма радионуклеидами за счет приема с пищей, водой или воздухом, используют комбинированный способ введения пероксиредоксина за счет одновременного применения внутривенных инъекций и аппликаций на место поражения, что
5 позволяет снизить токсикацию организма и предотвратить процесс неконтролируемой гибели клеток.

В фармацевтической композиции возможно использовать различные типы пероксиредоксинов (PrxI- PrxVI) поскольку распределение концентраций разных типов пероксиредоксинов различно в зависимости от типа ткани или органа (Клоорс
10 В. et al., 1999). Для формирования вариантов композиций предпочтительно использовать комбинацию из нескольких типов пероксиредоксинов которые имеют максимальную концентрацию для каждого конкретного органа или ткани. Возможно использовать рекомбинантные пероксиредоксины полученные из клеток растительного или животного происхождения после их отбора с помощью тестов на
15 биологическую активность и способность не вызывать аллергические реакции. Например, для лечения воспалительных процессов в эпителиальных тканях более предпочтительно использовать рекомбинантные PrxV1hum и/или Δ PrxV1hum которые обладает более сильными антиоксидантными характеристиками по сравнению с I-V типами пероксиредоксинов.

20 Для лечения воспалительных процессов минимальную концентрацию пероксиредоксина PrxV1hum и/или Δ PrxV1hum в композиции определяют, во-первых, исходя из эффективной концентрации пероксиредоксина PrxVI при защите биомакромолекул от активных форм кислорода in vitro и, во-вторых, исходя из концентрации пероксиредоксина PrxVI в ткани в норме.

25 В зависимости от тяжести воспалительного процесса и выбранного способа лечения концентрация пероксиредоксина PrxV1hum и/или Δ PrxV1hum в лекарственном средстве или фармацевтической композиции может выбираться от 0.01 до 10.0 мг/мл.

Например, в случае поражения органов дыхания крысы раствором
30 липополисахарида и в случае химического ожога, эмпирически полученная концентрация пероксиредоксина PrxVI составила 0.5-1.0 мг/мл при аппликации 20-50 мкл его раствора непосредственно в трахею, что соответствовало от 10 до 50 мкг пероксиредоксина PrxVI на крысу. Учитывая площадь поверхности трахеи крысы, это соответствует аппликации 5-10 мкг пероксиредоксина PrxVI на 1 см²

- 22 -

пораженной ткани. Это количество пероксиредоксина Prx VI может быть использовано при аппликации на пораженную ткань для любого млекопитающего, включая человека.

В случае применения пероксиредоксина в качестве радиопротектора количество пероксиредоксина PrxV1hum и/или Δ PrxV1hum, вводимого в организм перед облучением, может выбираться от 1 до 10 мг/кг веса животного и зависит от мощности излучения. В случае сублетальной дозы гамма-облучения, эмпирически полученное количество пероксиредоксина составило 2-5 мг/кг веса животного при инъекции 1 мл его раствора в вену. Это количество пероксиредоксина может быть использовано при введении для любого млекопитающего, включая человека.

Так как пероксиредоксин PrxV1hum и его фрагмент Δ PrxV1hum являются хорошо растворимыми белками, в качестве растворителей для проведения аппликации могут быть использованы физ.раствор, раствор Рингера и другие сбалансированные солевые растворы (Dawson R.M., 1986), а также растворы на основе моно или полисахаридов, например глюкозы, и/или содержащие витамины. Эти же растворители могут быть использованы при создании композиции в воздушно-капельной форме, например в форме спрея.

При применении пероксиредоксина и/или его фрагмента для лечения патологий, вызванных бактериальной флорой или иными факторами, эффективность композиции существенно возрастает при добавлении активатора пероксиредоксина, так как запасы собственных активаторов пероксиредоксина в организме ограничены. Более того, при наружном применении пероксиредоксина дефицит активатора очевиден. Классическим активатором пероксиредоксинов является дитиотрейтол (Novoselov S.V. et al., 1999). Однако ввиду его токсичности, применение его в лекарственных формах исключается. Одним из естественных активаторов пероксиредоксина VI является дигидролипоевая кислота, которая нетоксична и может быть получена восстановлением S-S связи широко используемой в медицине альфа-липоевой кислоты (1,2-дителиолан-3-пентановая кислота) (Sang W. K. et al., 1998). Дигидролипоевая кислота как активатор пероксиредоксина исследована в работе (Peshenko I.V. Shichi H., 2001) в in vitro экспериментах. Эффективность дигидролипоевой кислоты в качестве активатора пероксиредоксина in vivo продемонстрирована в примере 8.

Концентрацию дигидролипоевой кислоты в композиции выбирают в пределах от 0.01 до 10mg/ml в зависимости от концентрации пероксиредоксина (см. фиг. 11).

Использование пероксиредоксина и его естественного активатора в виде дигидролипоевой кислоты позволяет снизить концентрацию полипептида и активатора в композиции и снизить вероятность возникновения аллергических процессов в организме.

- 5 При генерализации воспалительного процесса (например, при возникновении сепсиса) с вовлечением нескольких органов и/или систем рекомендуется в состав лекарственного средства включать антибиотики и/или глюкокортикоиды в комбинации с композицией включающей пероксиредоксин и/или фрагмент пероксиредоксина и/или дигидролипоевую кислоту и проводить комбинированную
- 10 терапию.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ

- В общем случае композиция содержит эффективное количество, по крайней мере, одного вещества входящего в группу состоящую из пероксиредоксина, фрагмента пероксиредоксина, дигидрогидролипоевой кислоты, в композиции с
- 15 фармацевтически приемлемыми добавками в следующих соотношениях мас. %
- i) пероксиредоксин от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное;
 - ii) пероксиредоксин и дигидролипоевая кислота в сумме от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное, где соотношение пероксиредоксина к дигидролипоевой кислоте составляет от 1 до 50(w/w).
 - 20 iii) фрагмент пероксиредоксина от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное;
 - iv) фрагмент пероксиредоксина и дигидролипоевая кислота в сумме от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное, где соотношение пероксиредоксина к дигидролипоевой кислоте составляет от 1 до 50(w/w);
 - 25 v) пероксиредоксин от 5,0 до 45,0 вместе с фрагментом пероксиредоксина от 5,0 до 45,0 и фармацевтические добавки – остальное;
 - vi) пероксиредоксин от 5,0 до 45,0, фрагмент пероксиредоксина от 5,0 до 45,0 и дигидролипоевая кислота от 1,0 до 50,0 в сумме до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное, где соотношение пероксиредоксина вместе с фрагментом пероксиредоксина к
 - 30 дигидролипоевой кислоте составляет от 1 до 50 (w/w).

В качестве фармацевтических добавок могут быть использованы моно или полисахариды, аминокислоты, низкомолекулярные белки используемые для стабилизации и последующей лиофилизации композиции.

Фармацевтическая композиция, выполненная в форме раствора для внутреннего введения содержит от 0,01 до 0,5%, предпочтительно от 0,01 до 0,1%, основного действующего вещества, в форме для обработки раневых поверхностей или в форме мази или суппозитариев для ректального или интравагинального введения содержит
5 от 0,1 до 1,0% основного действующего вещества, в форме раствора для глазных капель содержит от 0,1 до 0,3% основного действующего вещества.

При создании жидких сред используют растворитель, выбираемый из группы: а) сбалансированного солевого раствора, б) сбалансированного солевого раствора и активатора пероксиредоксина в концентрации от 0,001% до 1,0 % (w/w).

10 При создании лиофилизированных форм используют моно и/или полисахариды, которые известны для стабилизации биологически активных полипептидов для фармакологии. Лيوфилизированные формы могут быть использованы для приготовления порошков выбираемых из группы: порошок для приготовления инъекционных, инфузионных растворов, порошок для ингаляций, порошок для
15 применения в мазях, гелях, суспензиях, порошок для приготовления таблетированных форм.

Концентрация пероксиредоксина в составе порошка составляет от 0,1% до 90%. В таблетированной форме, которую используют сублингвально, концентрация пероксиредоксина может составлять от 0,01% до 1,0%.

20 Возможно применение комплексного лечения, когда композицию, включающую пероксиредоксин и/или фрагмент пероксиредоксина и/или активатор, применяют совместно или предварительно или после применения, по крайней мере, одного терапевтического агента широкого спектра действия.

Терапевтический агент выбирают из группы состоящей из: i) антибактериальных, 25 антивирусных, антигрибных, антигистаминных препаратов, ii) высокомолекулярных ферментов, которые обеспечивают дополнительную защиту от свободных радикалов (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза), iii) низкомолекулярных соединений, обеспечивающих дополнительное снижение уровня свободных радикалов внутри клетки (токоферол глутатион, убихинон), iv)
30 препаратов используемых для трансплантации или криоконсервации органов, v) биологически активных белков, например инсулина, vi) гормонов, vii) витаминов, viii) цитокинов.

Терапевтический агент, применяемый совместно с пероксиредоксином, не должен ингибировать биологическую активность пероксиредоксина как фермента.

- 25 -

Представленные формы композиции и способы ее применения не ограничивают других вариантов, которые известны из области медицины или ветеринарии при применении антиоксидантной терапии. Вариации, вытекающие из данного изобретения и очевидные каждому специалисту, имеющему средний уровень знаний в данной области, должны рассматриваться в рамках предполагаемого изобретения.

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА И ЕГО ФРАГМЕНТА

Для проверки эффективности композиции и для выяснения свойств натурального и рекомбинантного пероксиредоксинов использовали способ выделения натурального белка из органов млекопитающих (Pesenko I.V. et al. 1998), или получали рекомбинантный белок и/или его фрагмент, используя прокариотическую экспрессионную систему (Меркулова и др., 2002). В качестве примеров рассмотрены способы получения рекомбинантного пероксиредоксина PrxV1hum и его фрагмента Δ PrxV1hum, которые включают, но не ограничивают применение других типов пероксиредоксинов.

Пример 1. Получение натурального пероксиредоксина крысы PrxV1rat

Получение натурального PrxV1rat проводили по следующей процедуре. Пероксиредоксин PrxV1rat выделяли из обонятельного эпителия крысы линии Вистар, который содержит максимальное количество этого белка. Изолированный обонятельный эпителий дважды промывали в физиологическом растворе и гомогенизировали в нем же. Гомогенат центрифугировали 5 мин при 500g, супернатант повторно дважды центрифугировали при 20000g и диализовали в течение 12 часов против раствора А в состав которого входит: 12 мМ Трис/HCl, pH 7.8, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитол. После диализа экстракт наносили на хроматографическую колонку (305 x 12.5 мм), заполненную гелем ДЭАЭ-сефарозой (DEAE-Sepharose, Pharmacia) и предварительно уравновешенную раствором А. Белки элюировали при линейном изменении градиента NaCl от 0мМ до 500 мМ в растворе А при 17°C. Объем раствора составлял 750 мл, скорость элюции 0.7 мл/мин. Фракции анализировали по антиоксидантной активности. Фракции, содержащие PrxV1rat, концентрировали и затем хроматографировали на колонке, заполненной гелем Sephacryl S-200 (820x16 мм). Колонку элюировали буфером Б: 25 мМ Трис/HCl, pH 7.8, 100 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитол. Скорость элюции - 0.6 мл/мин, при t₀ - 4°C. Фракции, содержащие PrxV1rat, собирали,

концентрировали, диализовали против физиологического раствора и использовали в дальнейших экспериментах. Первичная структура PrxVI крысы (Андреева С.Г. и др., 1998) содержит 223 аминокислоты с рассчитанной молекулярной массой 24630 Да. (EMBL/GenBank, Y17295).

- 5 Пример 2. Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК рЕТ23-a(+)*PrxV1hum*, кодирующей полноразмерный PrxV1hum.

Комплементарная ДНК, кодирующая человеческий пероксиредоксин PrxV1hum, (SEQ ID NO: 1) была выделена из клона HA0683 (Nagase T. et al., 1995, GenBank, D14662) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Taylor G., 1994) с использованием в качестве праймеров олигонуклеотидов, в последовательности которых введены точечные замены для создания соответствующих участков рестрикции. В качестве прямого праймера используют последовательность 5'-ATCACCGTCCATATGCCCCGAGG-3' (SEQ ID NO: 3) (подчеркнут сайт узнавания рестриктазы *NdeI*), в качестве обратного праймера используют последовательность 15 5'-CCAGAAATCTTAAGGCTGGGGTGTG-3' (SEQ ID NO: 4) (подчеркнут участок узнавания рестриктазы *EcoRI*).

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержит (в объеме 50 мкл): 1 нг плазмидной ДНК, 20 пмоль каждого праймера, 5 мкл 10-кратного буфера для ПЦР фирмы «Promega», 200 мкМ каждого dNTP, 5 единиц Taq-полимеразы. Реакцию 20 начинают со стадии предварительной денатурации ДНК - 94°C, в течение 5 мин, затем проводят 30 циклов ПЦР при следующих параметрах температурного цикла: денатурация - 30 с при 94°C, отжиг с праймерами - 30 с при 60°C, элонгация - 45 с при 72°C с последующей инкубацией при 72°C в течение 5 мин. После обработки продукта реакции соответствующими рестриктазами кДНК пероксиредоксина клонируют в 25 плазмиду рЕТ23-a(+/-) по сайтам рестрикции *NdeI-EcoRI*, с помощью рестрикционных ферментов фирмы MBI Fermentas (Studier, F.W., Moffatt, B.A., 1986). На фиг. 1 представлена физическая карта рекомбинантной плазмиды рЕТ23-a(+)*PrxV1hum*.

- Пример 3. Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК рЕТ23-a(+) Δ *PrxV1hum*, кодирующей N-концевой фрагмент Prx VI человека.

30 Исходной плазмидой для конструирования новых последовательностей фрагментов ДНК, кодирующих фрагменты полипептидов Δ *PrxV1hum*, служит плазида рЕТ23-a(+)*PrxV1hum*, детерминирующая экспрессию полноразмерного рекомбинантного PrxV1hum, которую используют в качестве матрицы для ПЦР. В качестве одного из вариантов короткого фрагмента ДНК выбран N-концевой фрагмент Δ *PrxVI* длиной

- 27 -

177 а.о. (SEQ ID NO: 2). В качестве прямого праймера используют последовательность 5'-GCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG -3' (SEQ ID NO: 5) (комплементарный промоторной области вектора pET23-a(+) Δ PrxV1hum). В качестве обратного праймера используют последовательность 5'-CCA TCC TTC GAA
5 TTC AAC TTA GGT GGC-3' (SEQ ID NO: 6) (подчеркнут сайт рестриктазы *EcoRI*).

Реакционная смесь содержит (в объеме 50 мкл): - 1 нг плазмидной ДНК, 20 пмоль каждого праймера, 5 мкл буфера для ПЦР («Promega», США), 200 мкМ каждого dNTP, 5 единиц Taq-полимеразы. Реакцию начинают с предварительной денатурации ДНК при 94°C в течение 3 мин, затем проводят 10 циклов ПЦР при следующих параметрах
10 температурного цикла: денатурация - 30 с при 94°C, отжиг с праймерами - 30 с при 55°C, элонгация - 45 с при 72°C, затем ещё 10 циклов реакции: денатурация - 30 с при 94°C, отжиг с праймерами - 30 с при 62°C, элонгация - 45 с при 72°C с последующей инкубацией при 72°C в течение 5 мин. После обработки соответствующими рестриктазами фрагмент Δ PrxV1hum лигируют с *NdeI-EcoRI*-фрагментом плазмиды
15 pET23-a(+) с использованием ДНК-лигазы фага T4. Точность сборки конструкции проверяют рестрикционным анализом и секвенированием полученной вставки по модифицированному методу Сенгера (Sanger F et al., 1997) На фиг. 2 представлена физическая карта рекомбинантной плазмиды pET23-a(+) Δ PrxV1hum.

Пример 4. Экспрессия кДНК пероксиредоксина PrxV1hum и фрагмента кДНК
20 Δ PrxV1hum в штамме *E.coli*.

Для экспрессии фрагментов кДНК пероксиредоксина PrxV1hum или пероксиредоксина Δ PrxV1hum в качестве штамма-хозяина выбирают штамм *E.coli* BL-21(DE-3), несущий в хромосоме ген РНК-полимеразы фага T7 под контролем индуцибельного *lac*-промотора (Studier F.W., Moffatt B.A., 1986).
25 Трансформацию компетентных клеток *E.coli* BL-21(DE-3) осуществляют химическим методом с использованием хлорида кальция (Sambrook J. Et al., 1989). Полученные штамм *E. coli* BL21/DE3/pET23-a-PrxV1hum для продуцирования полноразмерного пероксиредоксина и штамм *E. coli* BL21/DE3/pET23-a(+) Δ PrxV1hum для продуцирования фрагмента
30 пероксиредоксина характеризуются следующими основными признаками. Морфологические признаки: клетки мелкие палочковидной формы, грамотрицательные, неспороносные, 1х3,5 мкм, подвижные. Культуральные признаки: при росте на агаризованной среде LB колонии круглые, гладкие, полупрозрачные, блестящие, серые. Край ровный, диаметр колоний 1-3 мм,

консистенция пастообразная. Рост в жидких средах (LB, минимальная среда с глюкозой) характеризуется ровным помутнением, осадок легко седиментирует. Физико-биохимические признаки: клетки растут при 4-42°C, оптимум pH 6,8-7,6. В качестве источника азота используют как минеральные соли азота, так и органические соединения: аминокислоты, пептон, триптон, дрожжевой экстракт. В качестве источника углерода при росте на минимальной среде используют глицерин, углеводы, аминокислоты. Устойчивость к антибиотикам: клетки штамма-продуцента проявляют устойчивость к ампициллину (до 300 мг/мл), обусловленную наличием в плазмиде гена β -лактамазы (bla).

- 10 Для наработки рекомбинантного белка пероксиредоксина PrxV1hum или пероксиредоксина PrxV1hum клетки выращивают при 37°C до достижения в жидкой культуре значения поглощения A_{600} 0,6. Затем для индукции экспрессии белков добавляют индуктор *lac*-промотора ИПТГ до конечной концентрации 0,4 mM и продолжают инкубацию еще 4-5 ч. После этого суспензию клеток подвергают
- 15 центрифугированию при 4000g в течение 20 мин при 4°C. Осадок, содержащий клетки штамма-продуцента, разрушают ультразвуком и повторно центрифугируют. Белковую фракцию, содержащую в своем составе целевой продукт, высаживают насыщенным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и диализуют против 12 mM Трис-HCl буфера (pH 7,8), в состав которого входят 1 mM MgCl_2 и 1 mM ДДТ. Белковую смесь хроматографируют на
- 20 ДЭАЭ-сефарозе в градиенте хлорида натрия. Фракции, содержащие целевой полипептид, подвергают дальнейшей очистке с помощью гель-фильтрации на сефакриле S-200 и анализируют с помощью полиакриламидного гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия.

Пример 5. Определение продуктивности штамма-продуцента Δ PrxV1hum.

- 25 В 5 мл жидкой среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, вносят индивидуальную колонию клеток *E.coli* BL21/DE3, содержащую сконструированную плазмиду pET23-a(+) Δ PrxV1hum. Выращивают при 37°C на качалке при 180 об/мин в течение 2,5 ч до достижения в жидкой культуре значения поглощения A_{600} 0,6. Затем добавляют ИПТГ до концентрации 0,4 mM и продолжают инкубацию в тех же
- 30 условиях в течение 6 ч. Отбирают пробу 1 мл и центрифугируют 5 мин при 6 000 об/мин, после чего клетки суспендируют в 100 мкл буфера, содержащего 125 mM Трис-HCl (pH 6,8), 20% глицерина, 3% додецилсульфата натрия и 0,01% бромфенолового синего. Клеточную суспензию прогревают 10 мин на кипящей водяной бане. Отбирают образцы 2,5 мкл, 5мкл, 7,5 мкл, 10мкл и 15мкл и анализируют электрофорезом в 15%-

- 29 -

ном полиакриламидном геле, содержащем 0,1% додецилсульфата натрия (Laemmli U.K., 1970). Гель окрашивают Кумасси R-250 и сканируют на лазерном денситометре Ultrascan XL. По данным сканирования полипептид Δ PrxV1hum составлял 30% суммарного клеточного белка, что соответствует выходу конечного чистого белкового продукта 30 мг/л культуры клеток.

СВОЙСТВА НАТУРАЛЬНОГО, РЕКОМБИНАНТНОГО ПЕРОКСИРЕДОКСИНА И ЕГО ФРАГМЕНТА

Пример 6. Сравнение протекторных свойств рекомбинантного полноразмерного PrxV1hum с протекторными свойствами натурального крысиного PrxV1rat и с протекторными свойствами N-концевого фрагмента Δ PrxV1hum по защите глутаминсинтетазы *E. coli* от инактивации в модельной окислительной системе *in vitro*.

Для определения активности разных типов пероксиредоксинов измеряют их способность защищать глутаминсинтетазу против ДТТ/ $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$ окислительной системы. Глутаминсинтетазу выделяют из клеток *E. coli* штамма DH5 α (Streicher S.L., Tyler B., 1980) и инактивируют в присутствии $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$ окислительной системы и активатора пероксиредоксина - в модельной окислительной системе, генерирующей свободные радикалы (Kim K., et al., 1988). Используют инкубационную смесь объемом 60 мкл, которая содержит 5 мкг глутаминсинтетазы, 3 мМ активатора, 3 мкМ Fe^{3+} , 50 мМ HEPES, pH 7.3, инкубируют 10 мин при 37 $^{\circ}$ C. В качестве активатора натурального крысиного PrxV1rat используют ДТТ. В качестве активатора рекомбинантного PrxV1hum используют дигидролипоевую кислоту. Остаточную активность глутаминсинтетазы определяют приливанием к пробе 200 мкл реакционной смеси, которая содержит: АДФ- 0.4 мМ, глутамин - 150 мМ, K-AsO $_4$ - 10 мМ, NH $_2$ OH - 20 мМ, MnCl $_2$ - 0.4 мМ, HEPES - 100 мМ pH 7.4. После инкубации в течение 10 мин при 37 $^{\circ}$ C, к пробе приливают 100 мкл красителя. В состав красителя входит: 5,5 г FeCl $_3$ ·6 H $_2$ O, 2 г ТХУ, 2.1 мл конц. HCl (38%) на 100 мл H $_2$ O. Протекторные свойства пероксиредоксина по защите глутаминсинтетазы *E. coli* от инактивации определяют как отношение оставшейся активности фермента после инактивации в присутствии разных концентраций пероксиредоксина к активности неинактивированной глутаминсинтетазы. Результаты тестов показывают, что рекомбинантный полноразмерный PrxV1hum имеет антиоксидантные характеристики, близкие к натуральному крысиному пероксиредоксину PrxV1rat. В свою очередь N-концевой фрагмент Δ PrxV1hum имеет антиоксидантные характеристики, близкие к рекомбинантному полноразмерному PrxV1hum (см фиг. 3).

Пример 7. Определение цитотоксичности пероксиредоксинов

Цитотоксичность определяют по влиянию рекомбинантного PrxV1hum или натурального крысиного PrxV1rat на уровень пролиферации клеток линии L929 лимфобластомы человека и Т-лимфоцитов из селезенки мышей линии NRRI 5 стимулированных конканавалином А.

Клетки двух линий с концентрацией 10^4 клеток/мл среды культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 5% бычьей эмбриональной сыворотки. Стимуляцию Т-лимфоцитов проводили при концентрации конканавалина А 0.1 мкг/мл. В случае Т-лимфоцитов уровень пролиферации определяли по включению ^3H -тимидина. 10 Количество живых клеток линии L929 определяли в 96-луночной плашке с помощью красителя тренового с последующим сканированием на многоканальном фотометре Мультискан (LKB, Швеция).

Натуральный PrxV1rat и рекомбинантный PrxV1hum пероксиредоксины (в концентрации 0.1-10 мг/мл) не оказали никакого влияния на количество живых 15 клеток линии L929 (см фиг. 4). В случае Т-лимфоцитов, стимулированных конканавалином А, уровень пролиферации клеток увеличивался примерно в 2 раза в присутствии натурального крысиного или рекомбинантного PrxV1hum (в концентрации 0.1-1.0 мг/мл) по сравнению с просто стимулированными конканавалином А клетками.

20 Пример 8. Сравнительные характеристики активаторов пероксиредоксина.

Для определения эффективности активации пероксиредоксина VI дитиотреитолом или дигидролипоевой кислотой (натуральный активатор) используют способность пероксиредоксина защищать глутаминсинтетазу от инактивации, вызванной металл-катализируемой окислительной системой. 25 Инкубационная смесь объемом 60 мкл содержала 5 мкг глутаминсинтетазы, 50 мкг пероксиредоксина VI, 3 mM аскорбиновой кислоты, 3мкМ Fe^{+3} , 50 mM HEPES, pH 7.3 и дитиотреитол или дигидролипоевая кислота разных концентраций, инкубировалась 10 мин при 37°C . Остаточную активность глутаминсинтетазы определяли приливанием к пробе 200 мкл реакционной смеси (АДФ- 0.4 mM, 30 глутамин - 150 mM, K-AsO₄ - 10 mM, NH₂OH - 20 mM, MnCl₂ - 0.4 mM, HEPES - 100 mM, pH 7.4). После инкубации в течение 10 мин при 37°C , к пробе приливали 100 мкл красителя. В состав красителя входит 5,5 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 2 г ТХУ, 2.1 мл конц. HCl (38%) на 100 мл H₂O. Степень активности пероксиредоксина определяли

- 31 -

по значению концентрации белка, при которой наблюдалось 50% сохранение активности глутаминсинтетазы.

На фиг.11 представлена степень защиты глутаминсинтетазы в зависимости от концентрации тиолов. Как видно из графиков, антиоксидантная эффективность дигидролипоевой кислоты практически идентична дитиотрейтолу и значительно превышает эффективность липоевой кислоты.

Пример 9. Распределение пероксиредоксина PrxVI в организме животного после его инъекции.

Для выявления распределения экзогенного пероксиредоксина PrxVI в различных тканях организма в вену крысы вводился рекомбинантный PrxVI_{hum}, меченый флуоресценлизотиоцианатом в количестве 10 мг на животное. Через определенные промежутки времени животных убивали, выделяли ткани различных органов и проводили люминесцентный анализ полученных образцов. Полученные данные показали, что через 15 минут после инъекции меченого пероксиредоксина PrxVI, последний равномерно распределяется по всем органам крысы, включая мозг. Исключение составляет костный мозг, где количество экзогенного пероксиредоксина PrxVI было мало по сравнению с другими тканями. Таким образом, способ введения пероксиредоксина PrxVI с помощью инъекции в вену, позволяет повысить его содержание практически во всех тканях организма.

20 АНАЛИЗ СВОЙСТВ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА В ИССЛЕДОВАНИЯХ in vitro и in vivo.

Пример 10. Защита оксигемоглобина от действия ионизирующего облучения с помощью пероксиредоксина PrxVI.

Для проверки возможности защиты биомакромолекул от деструкции, вызванной ионизирующим излучением с помощью пероксиредоксина, было исследованы характеристики облученного оксигемоглобина в контроле и в присутствии пероксиредоксина. В контроле использовали раствор оксигемоглобина (0.16 D при 540 нм) в 0.1 М трис-HCl (pH 7.0), который облучали в установке ГУБЕ, с общей дозой облучения – 10 Гр. В качестве радиопротектора использовали пероксиредоксин PrxVI_{hum} при различных концентрациях (5-100 мкг/мл) в присутствии 50 мкМ дитиотрейтола. Образование окисленных форм оксигемоглобина (метгемоглобин) регистрировали при 635 нм, а агрегацию метгемоглобина регистрировали при 700 нм.

Пример 11. Определение пероксиредоксина PrxVI в биологических пробах.

Поликлональные кроличьи антитела против рекомбинантного пероксиредоксина получали стандартным способом путем двукратной иммунизации животного рекомбинантным человеческим пероксиредоксином. Титр полученных антител по ELISA составил 1:10000, по иммуноблотингу – 1:2000. Специфичность антител проверяли иммуноблотингом с использованием водорастворимого экстракта трахеи человека и иммуногистохимическими методами, используя парафиновые срезы легких человека, которые показали высокую степень специфичности полученных антител.

Очищенные кроличьи антитела получали из сыворотки осаждением сульфатом аммония с последующей хроматографией на ДЭАЭ целлюлозе. Конъюгаты антител с пришитой пероксидазой хрена получали стандартным методом периодатного окисления по способу Вильсона и Накане с молярным соотношением иммуноглобулина к пероксидазе равным 1:3.

Титр конъюгата для человеческого пероксиредоксина составил: для ELISA 1:1000 и для иммуноблотинга и иммуногистохимии 1:500. Специфичность конъюгата соответствовала специфичности сыворотки, которая была использована для получения IgG.

Протокол иммуноферментного определения пероксиредоксина P_{rx}VI в биологических пробах:

1. В лунки плашки заливают 200 мкл раствора иммуноглобулина G против человеческого рекомбинантного пероксиредоксина (разведение 1:1000) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре.

2. Плашки промывают физраствором (3 X 5 мин) и блокируют 1% сухим молоком в течение 30 мин при комнатной температуре.

3. В лунки заливают 200 мкл исследуемых проб и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре.

4. Плашки промывают физраствором, содержащим 0,1% Твин 40 (3 X 5 мин)

5. В лунки плашки заливают 200 мкл раствора конъюгата (разведение 1:500) и инкубируют в течение 30 мин при комнатной температуре

6. Плашки промывают физраствором, содержащим 0,1% Твин 40 (3 X 5 мин)

7. В лунки заливают раствор ABTS (25 мг ABTS в 25 мл цитратного буфера, pH 4,0 + 40 мкл 3% перекиси)

8. Плашки сканируют на Мультискане при 405 нм

Чувствительность системы составляет десятки нанограмм в миллилитре пробы (Chuchalin AG.et al. , 2003).

Пример 12. Иммуногистохимическое выявление пероксиредоксина P_{rx}VI в тканях человека.

5 Выделенную ткань фиксировали в 4% формальдегиде и 0,25% глутаральдегида на 20мМ фосфатном буфере, содержащем 0,15 М NaCl. Фиксацию проводили в течение 12 часов при 37 °С. Ткань промывали в физрастворе 4 раза в течение часа. Ткань дегидратировали последовательной проводкой через этиловый спирт с
10 возрастающей концентрацией (40-100%). Ткань промывали раствором ксилол-спирт (1:1) в течение часа, ксилолом и ксилол-парафин (1:1) в течение 12 часов. Ткань заключали в парафин и получали 5 мк срезы на микротоме. Срезы депарафинизировали в ксилоле и уменьшающимися концентрациями спирта. Срезы промывали физраствором, блокировали 5% фетальной сывороткой, эндогенную пероксидазу ингибировали 0,3% перекисью водорода и инкубировали с конъюгатом
15 в течение часа, трижды промывали физраствором и окрашивали диаминобензидином (6 мг на 10 мл 50 мМ трис-HCl буфера, pH 7,6 плюс 200 мкл 3% перекиси водорода).

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ И ПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ПЕРОКСИРЕДОКСИНА

20 Предлагаемое описание, включает конкретные примеры реализации настоящего изобретения, которые не следует рассматривать в контексте ограничения области использования данного изобретения. Вариации, вытекающие из данного изобретения очевидные каждому специалисту, имеющему средний уровень знаний в данной области должны рассматриваться в рамках предлагаемого изобретения.

25 Пример 13. Протекторный эффект инъекции пероксиредоксина P_{rx}VI при поражающем действии ионизирующего облучения

Одновременное облучение всех животных (крысы линии Вистар весом 200 гр.) проводили на установке ГУБЭ. Доза облучения – 6 Гр. Крыс распределили на две группы. Первая группа животных (n=6) использовалась для контроля. Животным
30 второй группы (n=6) за 30-60 минут до облучения внутривенно вводили 1 мг пероксиредоксина P_{rx} VI (1 мл физ.раствора при концентрации пероксиредоксина 1 мг/мл). После облучения животных содержали в общем помещении с достаточным количеством корма, освещением и вентиляцией. На гистологическое исследование

отбирали животных из каждой группы с признаками ухудшившегося общего состояния.

Данные по смертности животных после облучения для разных групп крыс представлены в таблице I. Как видно из таблицы, смертность крыс, которым перед облучением был введен пероксиредоксин PtxVI, существенно ниже, чем в контрольной группе. Общее состояние выживших животных через год после облучения существенно отличалось в пользу второй группы по сравнению с контрольной группой. У животных из первой группы (фиг.5A), по сравнению с животными второй группы (фиг. 5B), отмечается: большая потеря массы тела (кахексия) (вес 180—200 г), скудное оволосение тела, низкая двигательная активность, наличие опухолевого процесса.

Пример 14. Терапевтические и протекторные свойства пероксиредоксина PtxVI при лечении верхних дыхательных путей крысы после химического ожога

Терапевтические свойства рекомбинантного PtxVIhum при лечении верхних дыхательных путей крысы через сутки после ожога проверяли на группе из 4 крыс линии Вистар весом 150-200 грамм. Крыс анагезировали анальгином (100 мг/кг веса) и помещали в эксикатор, насыщенный парами соляной кислоты на 10 мин (объем эксикатора — 10 литров) (всего использовано 20 животных). После химического ожога крыс выдерживали определенное время (40 мин, 6 час, 1 сутки, 2 суток, 14 суток, 30 суток), усыпляли гексеналом (300 мг/кг веса) и выделяли пробу эпителиальной ткани трахеи. Для гистохимических исследований выделенную пробу помещали в фиксирующий раствор, содержащий 2% формальдегида и 0.5% глутаральдегида. Ткань дегидратировали последовательной проводкой через этиловый спирт с возрастающей концентрацией (40-100%). Ткань заливали в смолу LR white resin. Полимеризация смолы проводилась при комнатной температуре. Срезы толщиной 0,5 мкм, получали на ультратоме LKB, Швеция, используя стеклянные ножи. Срезы окрашивались смесью гематоксилина-эозина, анализировались на световом микроскопе.

На фиг.6B показан срез эпителия трахеи крысы через сутки после ожога, на фиг.7B — через 14 дней после ожога. Максимальное разрушение эпителия наблюдается через сутки после ожога, при этом реснитчатые клетки, обеспечивающие ток слизи в трахее, практически отсутствуют. Через две недели наблюдается частичное восстановление реснитчатых клеток. Аппликацию раствора PtxVIhum начинают через час после ожога для определения протекторного эффекта

- 35 -

пероксиредоксина или через сутки после химического ожога во время максимального разрушения эпителия слизистой трахеи, для исследования лечебного эффекта пероксиредоксина. В последнем случае аппликацию проводили один раз в день в течение 5 дней. Крыс предварительно усыпляли при помощи внутрибрюшинного введения гексенала (70 мг/кг), животных фиксировали на операционном столе и под визуальным контролем с помощью бинокулярной лупы через катетер диаметром 1 мм вводили в трахею раствор пероксиредоксина объемом от 20 до 100 мкл. Концентрацию пероксиредоксина выбирали в пределах от 0,5 до 5.0 мг/мл. В качестве растворителя использовали 0,9 % раствор NaCl.

10 Пример 15. Терапевтические свойства пероксиредоксина PrxVI при лечении верхних дыхательных путей крысы непосредственно после воздействия раствора ЛПС.

Терапевтические свойства пероксиредоксина PrxVI при лечении верхних дыхательных путей крысы непосредственно после аппликации ЛПС проверяли на группе из 4 крыс линии Вистар весом 150-200 грамм. Аппликацию ЛПС проводили следующим способом. Крыс анестезировали гексеналом и через катеттер вводили 100 мкл раствора липополисахарида (концентрация липополисахарида 10-9 – 10-11 мг/мл, всего использовано 20 животных). После аппликации липополисахарида выдерживали определенное время (1 час, 3 часа, 6 часов, 7 часов, 9 часов), усыпляли гексеналом (300 мг/кг веса) и выделяли пробу эпителиальной ткани трахеи. Для гистохимических исследований выделенную пробу помещали в фиксирующий раствор, содержащий 2% формальдегида и 0.5% глутаральдегида. Ткань дегидратировали последовательной проводкой через этиловый спирт с возрастающей концентрацией (40-100%). Ткань заливали в смолу LR white resin.

20 Полимеризация смолы проводилась при комнатной температуре. Срезы толщиной 0,5 мкм, получали на ультратоме LKB, Швеция, используя стеклянные ножи. Срезы окрашивались смесью гематоксилина-эозина, анализировались на световом микроскопе.

На фиг. 8С показаны срезы эпителия трахеи крысы через 3 час после аппликации липополисахарида. Гистологические исследования показали, что в случае применения ЛПС 10^{-7} мг/животное препарата отмечалась массивное накопление нейтрофилов в стенке трахеи, развитие отека с последующим отслоением слизистой в просвет трахеи и гибелью клеток через 3 часа.

Иммуногистохимические исследования показали, что во многих областях эпителия трахеи уже через час наблюдается массовая гибель клеток, секретирующих пероксиредоксин PrxVI, что приводило к отсутствию пероксиредоксина PrxVI в слизи, покрывающей данные области трахеи.

- 5 Для биохимических исследований соскабливали эпителий трахеи тонким шпателем, соскоб смывали физиологическим раствором и центрифугировали при 10 000g в течение 15 мин. Концентрацию перекиси водорода определяли методом люминисценции. Динамика активностей пероксиредоксина PrxVI, TNF- α и респираторный взрыв нейтрофилов после аппликации ЛПС в трахею крысы
- 10 показали, что максимум секреции пероксиредоксина наблюдался через час после аппликации ЛПС, в то время как максимум экспрессии TNF- α наблюдался через 3 часа и респираторный взрыв нейтрофилов через 6 часов. После ЛПС проводили аппликацию раствора композиции на основе пероксиредоксина PrxVI в трахею. Предварительно крыс усыпляли при помощи внутрибрюшинного введения
- 15 гексенала (70 мг/кг). Животных фиксировали на операционном столе и под визуальным контролем с помощью бинокулярной лупы через катетер диаметром 1 мм им вводили в трахею раствор пероксиредоксина (20 – 100 мкл). Концентрация пероксиредоксина - 0,5-5.0 мг/мл, в качестве растворителя использовались 0,9 % NaCl. Аппликацию раствора композиции проводили однократно непосредственно
- 20 после аппликации ЛПС. В качестве контроля использовалась аппликация чистого растворителя, растворы сывороточного альбумина (10 мг/мл) и глутатиона (10 мМ).

Через сутки после аппликации ЛПС проводили гистологическое исследование трахеи.

- На фиг.9А показан срез эпителия трахеи крысы через сутки после аппликации
- 25 ЛПС без аппликации рекомбинантного PrxVI. На фиг.9В показан срез эпителия трахеи крысы через сутки после аппликации ЛПС с последующей аппликацией пероксиредоксина сразу после ЛПС. Наблюдается полная сохранность эпителия. Единственное отличие от интактной трахеи состоит в том, что увеличилось количество макрофагов и тучных клеток. Как видно из фотографии наблюдалось
- 30 практически полное сохранение или восстановление эпителия трахеи.

Пример 16. Лечебные свойства пероксиредоксина PrxVI при лечении ран.

Предварительно крыс усыпляли при помощи внутрибрюшинного введения гексенала (70 мг/кг). Животных фиксировали на операционном столе и на наносили с помощью лезвия порезы кожи обеих лап глубиной 2-3 мм и длиной 1 см.

- 37 -

Контрольные порезы промывали физраствором и накладывали бактерицидный пластырь, в случае применения пероксиредоксина рану промывали раствором рекомбинантного PrxVHum или раствором его фрагмента ΔPrxVHum в 0.15 М NaCl в концентрации 0,5 мг/мл и накладывали марлевую повязку, смоченную теми же растворами. Повязки меняли раз в сутки. Эффект действия пероксиредоксинов представлен на фиг.10. Как видно на фотографии 10В и 10С в случае применения рекомбинантных PrxVHum и ΔPrxVHum перкосиредоксинов через 5 дней наблюдается практически полное заживление раны по сравнению с контролем. Гистологические исследования показали существенно меньшие рубцы в случае применения пероксиредоксинов VI.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

Фармакологическая композиция содержащая, по крайней мере, один тип пероксиредоксина может найти профилактическое и/или лечебное применение для многих болезней, которые сопровождаются гиперпродукцией свободных радикалов. Более высокая эффективность композиции на основе пероксиредоксина по сравнению с известными антиоксидантами позволяет повысить эффективность и сократить сроки лечения. Фармакологическая композиция не обладает токсичностью и биосовместима с организмом млекопитающих, в том числе и человека, так как в ней в качестве основного элемента используется рекомбинантный человеческий пероксиредоксин. Низкая токсичность композиции позволяет повысить эффективность лечения за счет одновременного комбинированного воздействия на локальные области организма и весь организм в целом за счет аппликаций и внутривенного введения композиции. Это особенно важно при лечении многофакторных воздействий на организм, например, радиации, термического, химического ожогов, ран, ушибов возникающих во время катастроф и пожаров. Композиция имеет высокую растворимость и быстро проникает в межклеточное пространство организма, что позволяет лечить заболевания практически всех органов. Композиция совместима с любыми фармацевтически пригодными носителями, не снижающими биологическую активность фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bauer V. and Bauer F.(1999) Reactive Oxygen Species as Mediators of Tissue Protection and Injury. Gen. Physiol. Biophys., 18, Focus Issue, 7-14.

2. Babish J.G., Howell T. Compositions containing carotenoids and tocotrienols and having synergistic antioxidant effect. PCT appl. WO0230419 (2002-04-18)
3. Gillissen A. and Nowak D. (1998) Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respir Med*, 92(4):609-623.
- 5 4. Kelly F.J. (1999) Gluthathione: in defence of lung. *Food Chem Toxicol*, 37(9-10): 963-966.
5. Tabot O., Eliot T. Composition and method for enchancing wound healing. US Pat. 6,187,743 (13.02.2001)
6. McLean L.R. et al. Synthetic lung sufactant having antioxidant properties. US Pat.
10 5,683,982 (04.11.1997)
7. White K., Kumuda C. Use of thioredoxin-like molecules for induction of MnSOD to treat oxidative damage. US Pat. 5,985,261 (16.11.1999)
8. Davis J.M., Rosenfeld W.N., Sanders R.J. and Gonenne A. (1993) Prophylactic effects of recombinant human superoxide dismutase in neonatal lung injury. *J.Appl. Physiol.*, 74:2234-2241.
- 15 9. Hellstrand, K. et al. Treatment and prevention of reactive oxygen metabolite-mediated cellular damage. US Patent Appl. 20010023256 (20.09.2001)
10. Vita J.A. et al. Methods of treating vascular diseases characterized by nitric oxide insufficiency PCT appl. WO0135961 (25.05.2001).
- 20 11. Chae H.Z., Robison K., Poole L.B., Church G., Storz G., and Rhee S.G. (1994) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:7017-7021.
12. McGonigle S., Dalton J. P., and James E.R. (1998) Peroxidoxins: a new antioxidant
25 family. *Parasitology Today*, 14:139-145.
13. Prosperi M.T., Ferbus D., Rouillard D., and Goubin G. (1993) A human cDNA corresponding to a gene over expressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 11050-11056,
14. Pesenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A., Nikolaev Ju.V., Kamzalov S.S.,
30 Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko E.E. (1998) Identification of a 28 kDa secretory protein from rat olfactory epithelium as a thiol-specific antioxidant. *Free Rad.Biol.Med.*, 25, 654-659.
15. Novoselov S.V., Peshenko I.V., Popov V.V., Novoselov V.I., Bystrova M.F., Evdokimov V.A., Kamzalov S.S., Merkulova M.I., Shuvaeva T.M., Lipkin V.M., Fesenko

E.E. (1999) Localization of the 28-kDa peroxiredoxin in rat epithelial tissues and its antioxidant properties. *Cell.Tissue.Res.* 298, 471-480.

16. Butterfield L.H. (1999) From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins. *Antioxid Redox Signal* Winter; 1(4):385-402.

5 17. Chung YM, Yoo YD, Park JK, Kim YT, Kim HJ. (2001) Increased expression of peroxiredoxin II confers resistance to cisplatin. *Anticancer Res.*, Mar-Apr; 21(2A):1129-33

18.Kinnula V.L. et al. (2002) Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* Mar;196(3):316-323

10 19.Kim S.H. et al. Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J Neural Transm Suppl* 2001;(61):223-235.

20.Das K.C. et al. (2001) Induction of peroxiredoxin gene expression by oxygen in lungs of newborn primates. *Am J Respir Cell Mol Biol* Aug; 25(2):226-232.

15 21. Kim H.S. et al. (2002) Regulation of 1-cys peroxiredoxin expression in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* Aug; 27(2): 227-233.

22. Fujii T. (2001) Augmented expression of peroxiredoxin VI in rat lung and kidney after birth implies an antioxidative role. *Eur J Biochem* Jan; 268(2):218-225

20 23. Lee SC. et al. (2000) Peroxiredoxin is ubiquitously expressed in rat skin: isotype-specific expression in the epidermis and hair follicle. *J Invest Dermatol* Dec; 115(6):1108-1114.

24. Park S.H. et al. (2000) Antisense of human peroxiredoxin II enhances radiation-induced cell death. *Clin Cancer Res.* Dec; 6(12):4915-4920.

25. Chandrashekar R., Tsuji N. *Dirofilaria* and *brugia* thioredoxin peroxidase type-2 proteins and uses thereof. U S Patent 6,352,836 (March 5, 2002)

25 26. Novoselov V.I., Amelina S.E., Kravchenko I.N., Novoselov S.V., Sadovnikov V.B., Fesenko E.E. Application of peroxiredoxine in the healing of lung. Problems of biological and ecological safety international conference. Obolensk p. 203 (22-25 May 2000)

30 27. Walker B.D., Lynn R. G. Peroxiredoxin drugs for treatment of HIV-1 infection and methods of use thereof. PCT appl. WO02077294 (03.10.2002)

28. Андреева С.Г. и др. (1998) Структурные исследования секреторного 28кДа белка из обонятельного эпителия крысы. *Биоорганическая химия*, т.24, N11 с. 816-821

29. Sang Won Kang, Bains I.C., Rhee S.G. (1998) Characterization of a mammalian peroxiredoxin contains one conserved cysteine. JBC, 273, 11, pp. 6303-6311.
30. Chen J.W., Dodia C., Feinstein S.I., Mahendra K.J., Fisher A.B. (2000) 1-Cys Peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A activities. JBC, 275, 37, pp. 28421-28427.
31. Peshenko I.V., Shichi H. (2001) Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxyxynitrite. Free Radic Biol Med Aug 1;31(3):292-303.
32. Nagase T., Miyajima N., Tanaka A., Sazuka T., Seki N., Sato S., Tabata S., Ishikawa K., Kawarabayashi Y., Kotani H., and Nomura N. (1995) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. DNA Res., 2, pp.37-43.
33. Knoops B., Clippe A., Bogard C., Arsalane K., Wattiez R., Hermans C., Duconseille E., Falmagne P., Bernard A. (1999) Cloning and characterization of AOEB166, a novel mammalian antioxidant enzyme of the peroxiredoxin family. J. Biol. Chem. 274, pp. 30451-30458.
33. Dawson R.M., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M. (1986) Data of Biochemical Research. Clarendon Press, Oxford,
34. Esenaliev R.O. Radiation and nanoparticles for enhancement of drug delivery in solid tumors. US Patent 6,165,440 (26.12.2000)
35. Thibeault D.W., Rezaiekhaliq M., Mabry S. and Beringer T. (1991) Prevention of chronic pulmonary oxygen toxicity in young rats with liposome encapsulated catalase administered intratracheally. Pediatr. Pulmonol. 11:318-327.
35. Меркулова М.И., Шуваева Т.М., Радченко В. В., Янин В.А., Бондарь А.А., Софии А.Д., Липкин В.М. (2002) Рекомбинантный пероксиредоксин VI человека: получение и протекторные свойства *in vitro* Биохимия, т.67, вып.11 с.1496-1501.
36. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol. 189: 113-130
37. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
38. Streicher S.L. Tyler B. (1980) Purification of Glutamine Synthetase from a Variety of Bacteria. J. of Bacteriology, p. 69-78.

39. Chuchalin AG, Novoselov VI, Shifrina ON, Soodaeva SK, Yanin VA, Barishnikova LM. (2003) Peroxiredoxin VI in human respiratory system. *Respir Med.* Feb; 97(2):147-151.

5 40. Kim K., Kim I.H., Lee K.Y., Rhee S.G., Stadtman E.R. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 4704-4711.

41. Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, p. 680-685.

42. Taylor G. (1994) In: *Polymerase Chain Reaction. A Practical Approach*, v.1, McPherson M.J., Quirke P., Taylor G. R. eds. Oxford Univ. Press. Oxford.

10 43. F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Nat. Acad.Sci. USA*, 74, p.5463-5467

ФОРМУЛА

1. Фармацевтическая композиция для антиоксидантной защиты клеток, тканей и организма в целом от гиперпродукции свободных радикалов, которая содержит эффективное количество, по крайней мере, одного вещества входящего в группу состоящую из полипептида пероксиредоксина, фрагмента полипептида пероксиредоксина, дигидролипоевой кислоты, в композиции с фармацевтически приемлемыми добавками в следующих соотношениях мас. %:
- i) пероксиредоксин от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное;
 - 10 ii) пероксиредоксин и дигидролипоевая кислота в сумме от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное, где соотношение пероксиредоксина к дигидролипоевой кислоте составляет от 1 до 50(w/w).
 - iii) фрагмент пероксиредоксина от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное;
 - 15 iv) фрагмент пероксиредоксина и дигидролипоевая кислота в сумме от 10,0 до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное, где соотношение пероксиредоксина к дигидролипоевой кислоте составляет от 1 до 50(w/w);
 - vi) пероксиредоксин от 5,0 до 45,0 вместе с фрагментом пероксиредоксина от 5,0 до 45,0 и фармацевтические добавки – остальное;
 - 20 vii) пероксиредоксин от 5,0 до 45,0, фрагмент пероксиредоксина от 5,0 до 45,0 и дигидролипоевая кислота от 1,0 до 50,0 в сумме до 90,0 и фармацевтические добавки – остальное, где соотношение пероксиредоксина вместе с фрагментом пероксиредоксина к дигидролипоевой кислоте составляет от 1 до 50 (w/w).
2. Фармацевтическая композиция по п.1 отличающаяся тем, что пероксиредоксин
- 25 выбирают из группы состоящей из: PrxI, PrxII, PrxIII, PrxIV, PrxV и PrxVI.
- 3 Фармацевтическая композиция по п.1 отличающаяся тем, что используют человеческий пероксиредоксин PrxVI_{hum}.
4. Способ повышения антиоксидантной защиты млекопитающих от экзогенных и/или эндогенных факторов, вызывающих патологию отличающийся тем, что
- 30 осуществляют контакт фармацевтической композиции по пп. 1-3, с межклеточным пространством ткани, органа или всего организма млекопитающего.
5. Способ по п.4 отличающийся тем, что контакт композиции с межклеточным пространством ткани, органа или организма в целом осуществляют посредством пассивной или активной диффузии при аппликации, распылении, или используют

- 43 -

доставку с помощью парентрального или эндолумбального введения с помощью инъекции, или используют парентральное введение с помощью инфузий, ингаляций, введения в дренаж, или используют сублингвальный, вагинальный, ректальный ввод, или используют капли в нос или глаза.

5 6. Способ по п.4 отличающийся тем, что дополнительно используют терапевтический агент, который применяют предварительно или одновременно или после применения композиции на основе пероксиредоксина.

7. Способ по п.6 отличающийся тем, что терапевтический агент выбирают из группы состоящей из: i) антибактериальных, антивирусных, антигрибных, антигистаминных препаратов, ii) высокомолекулярных ферментов, которые
10 обеспечивают дополнительную защиту от свободных радикалов в межклеточном пространстве, iii) низкомолекулярных соединений, обеспечивающих дополнительное снижение уровня свободных радикалов внутри клетки, iv) препаратов используемых для трансплантации или криоконсервации органов, v)
15 биологически активных белков, vi) гормонов, vii) витаминов, viii) цитокинов.

8. Способ получения полипептида с антиоксидантными свойствами по п.1, который включает выбор молекулы нуклеиновой кислоты для создания рекомбинантной плазмидной ДНК, культивирование линии клеток, трансформированных плазмидой в условиях, обеспечивающих продуцирование
20 указанного полипептида и/или его фрагмента и последующее выделение полипептида из клеточной культуры, отличающийся тем, что молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность натурального человеческого белка пероксиредоксина PrxVI_{hum} (SEQ ID NO: 1) или последовательность N-концевого фрагмента ДНК пероксиредоксина (Δ PrxVI_{hum}) (SEQ ID NO: 2), который
25 кодирует полипептид имеющий аналогичную антиоксидантную эффективность, но меньший размер и более высокую проникаемость в межклеточном пространстве.

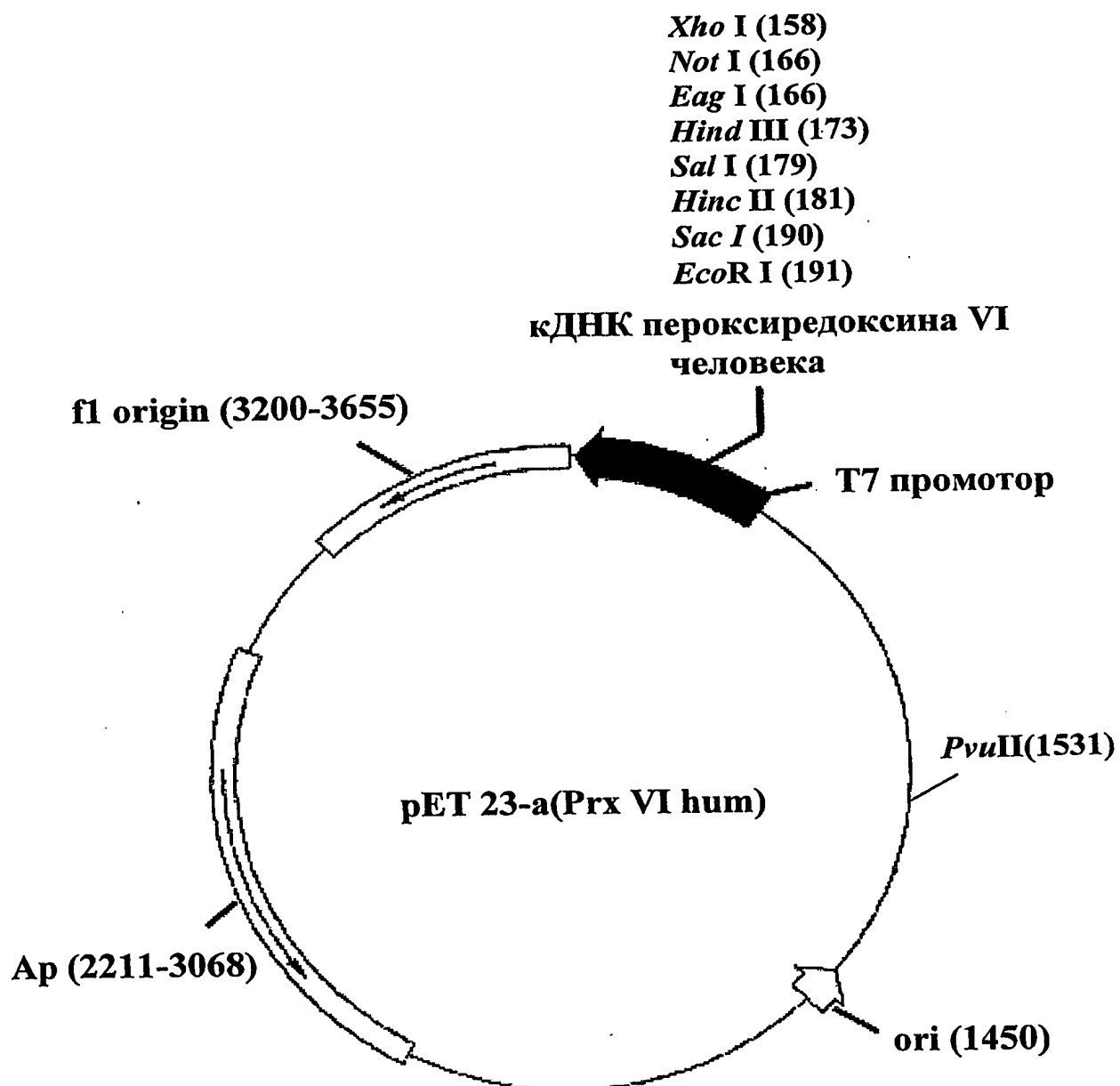
9. Молекула нуклеиновой кислоты по п.8, кодирующая белок, обладающий антиоксидантными свойствами, которая представляет собой ДНК или РНК, и включает нуклеотидную последовательность, соответствующую аминокислотной
30 последовательности натурального человеческого белка пероксиредоксина PrxVI (SEQ ID NO: 1) длиной 224 а.о. или N-концевой фрагмент ДНК пероксиредоксина Δ PrxVI_{hum} (SEQ ID NO: 2) длиной 177 а.о.или N-концевой фрагмент ДНК пероксиредоксина Δ PrxVI_{hum}, длину которого выбирают в пределах от 177 до 224 а.о.

- 44 -

10. Рекомбинантная плазмидная ДНК по п.8 для продуцирования натурального человеческого белка пероксиредоксина PrxVI или фрагмента пероксиредоксина Δ PrxV1hum, включающая нуклеотидные последовательности (SEQ ID NO: 1) или (SEQ ID NO: 2) функционально связанные с регуляторными последовательностями, обеспечивающими ее экспрессию в совместимой клетке-хозяине.
- 5

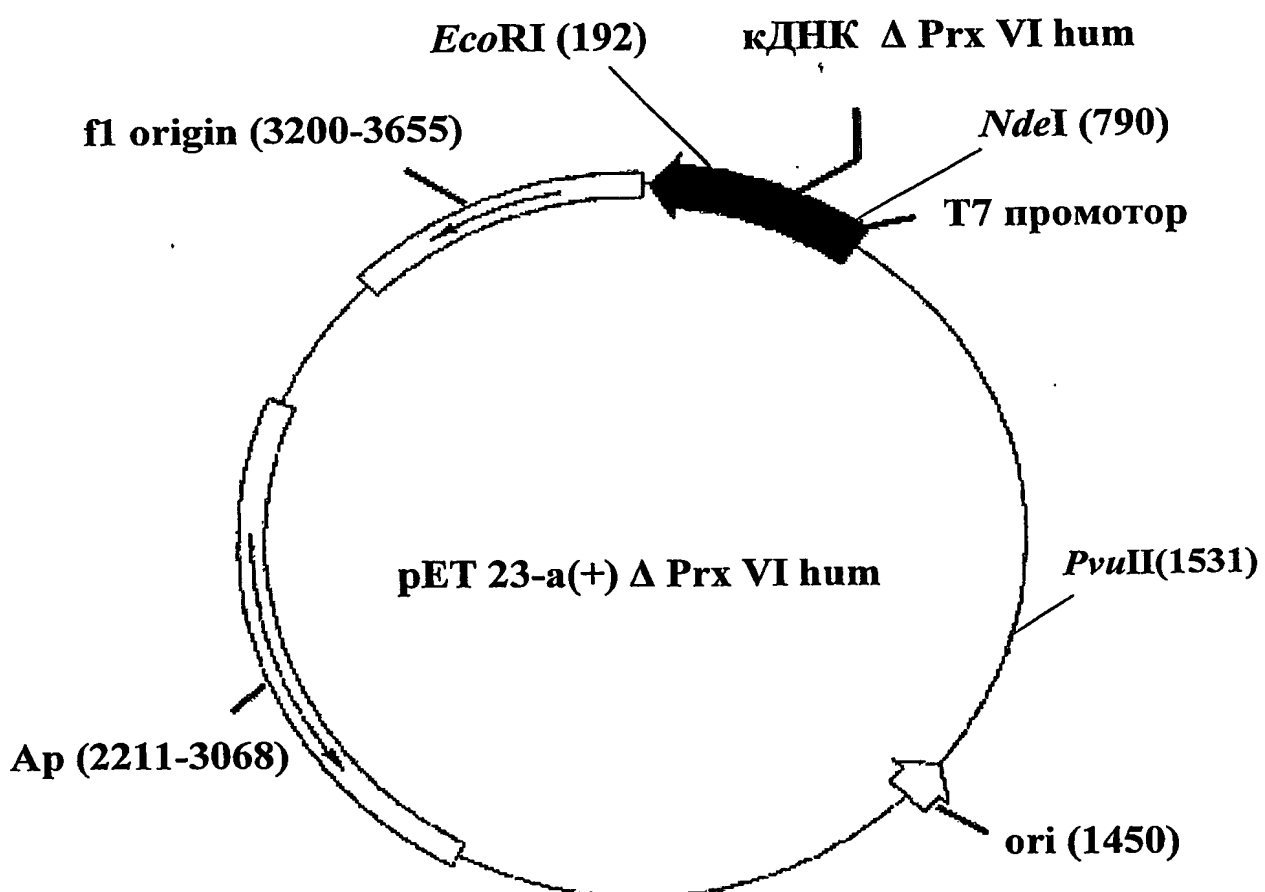
11. Штамм или линия клеток по п.8, трансформированные рекомбинантной плазмидной ДНК, являющиеся продуцентом полноразмерного рекомбинантного пероксиредоксина PrxV1hum или фрагмента пероксиредоксина Δ PrxV1hum.

1 / 11



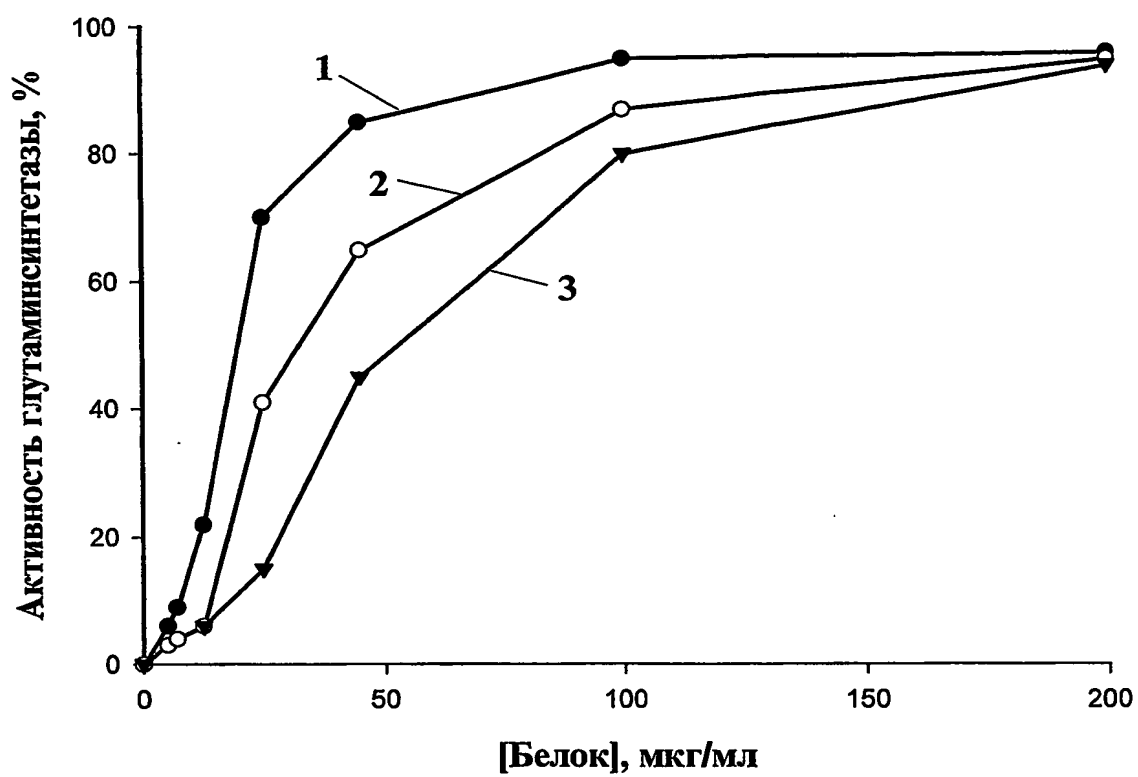
Фиг. 1

2 / 11



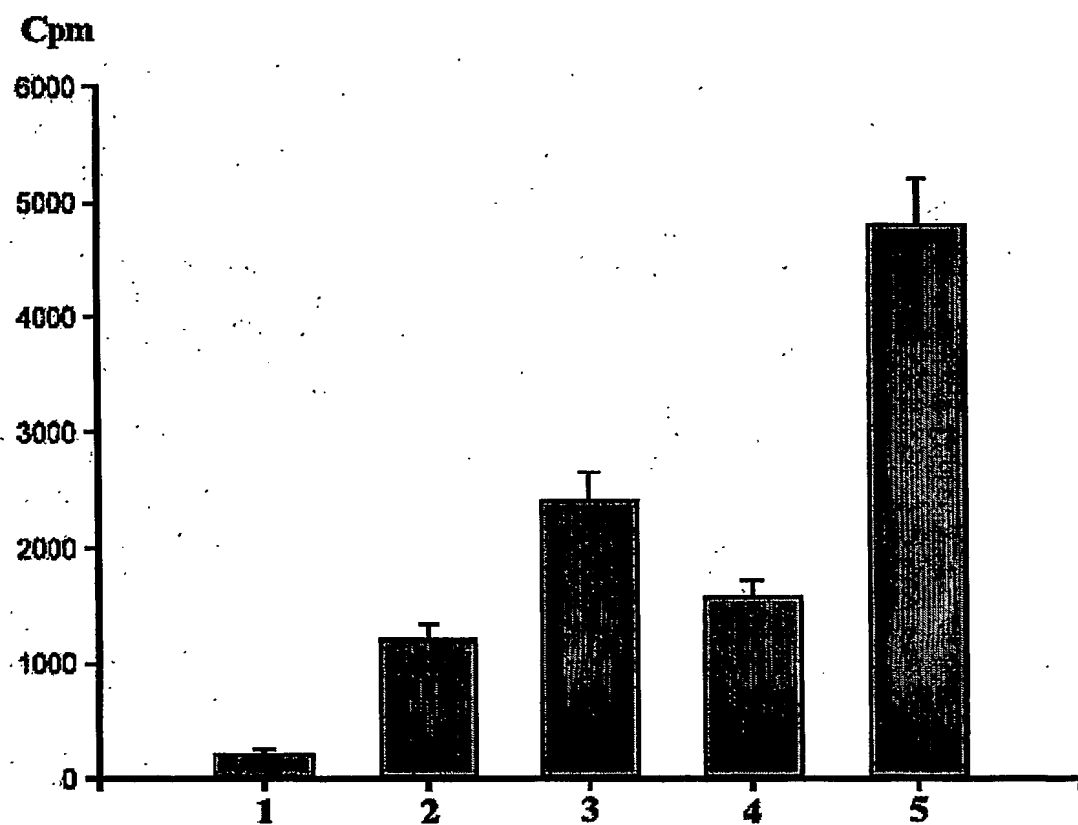
Фиг. 2

3 / 11



Фиг. 3

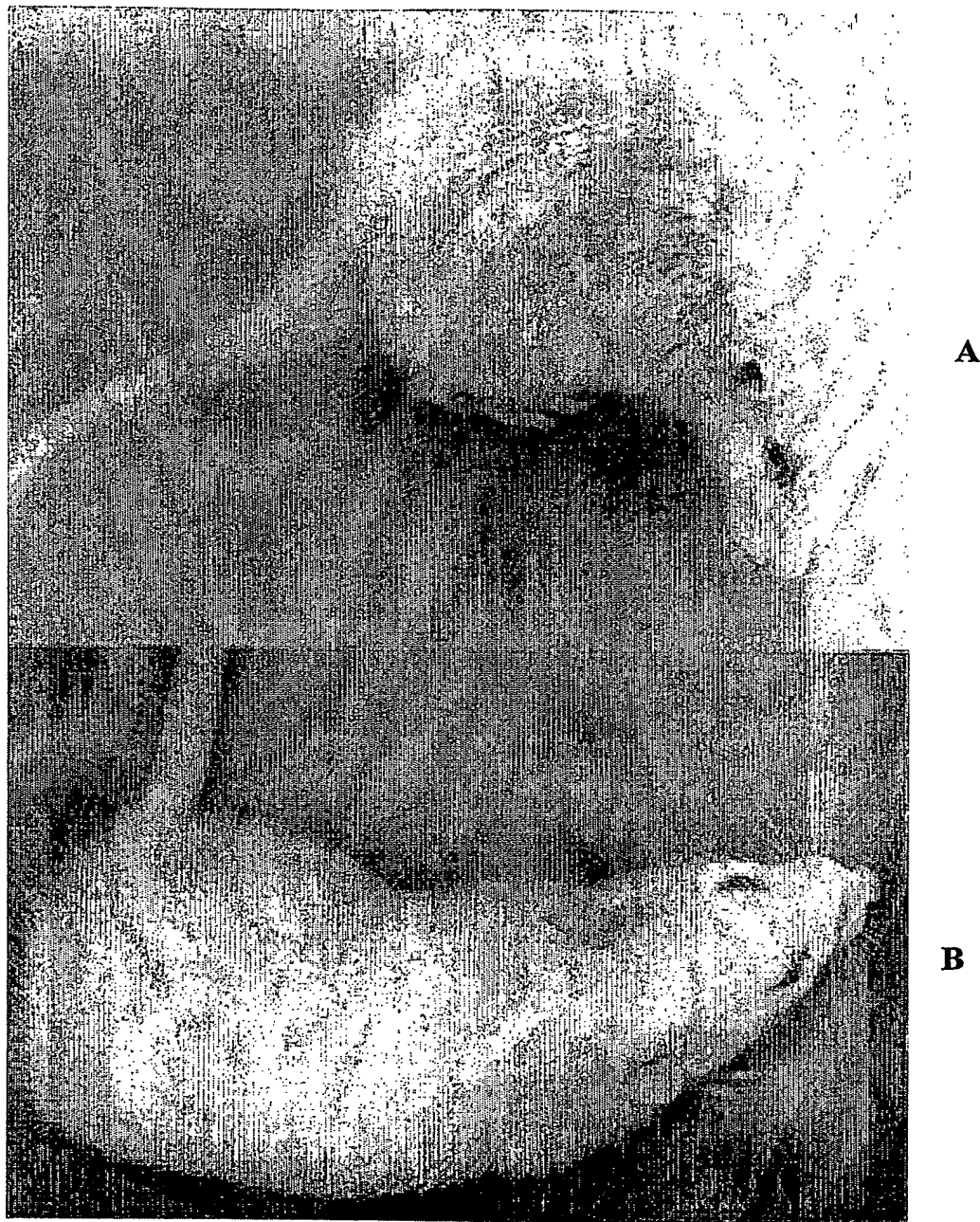
4 / 11



Фиг. 4

BEST AVAILABLE COPY

5/11



Фиг. 5

BEST AVAILABLE COPY

6 / 11

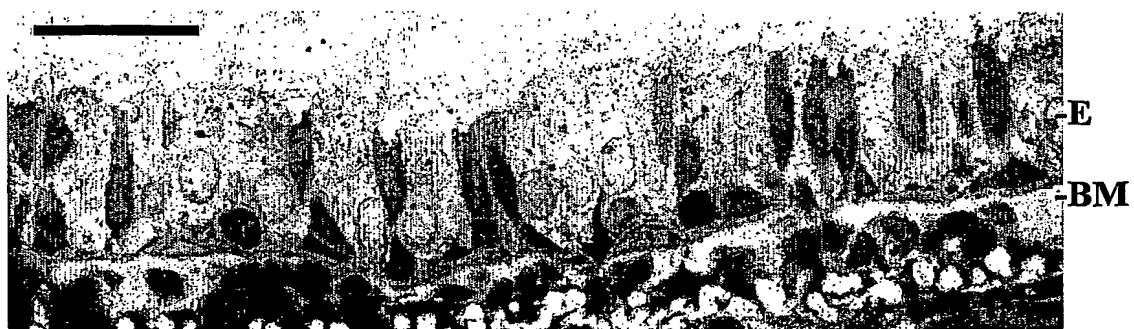
A



B



C



Фиг. 6

BEST AVAILABLE COPY

7/11
A



B



C



Фиг. 7

8 / 11

A



B



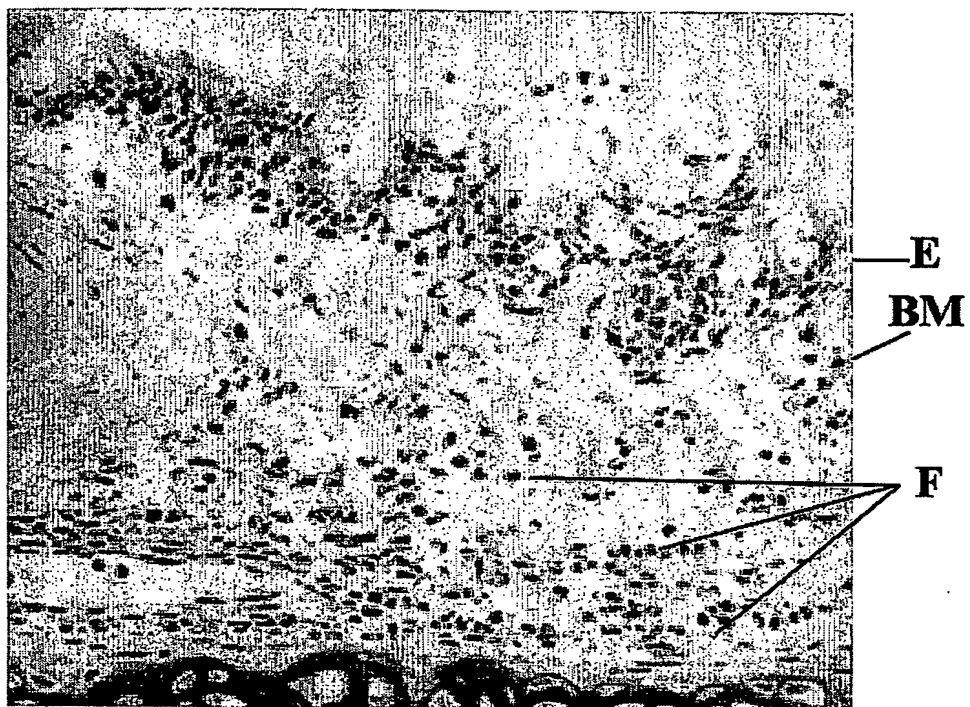
C



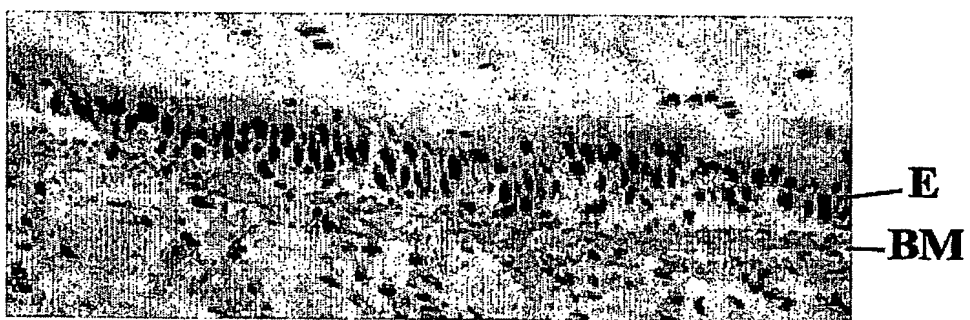
Фиг. 8

BEST AVAILABLE COPY

9 /11
A



B



Фиг. 9

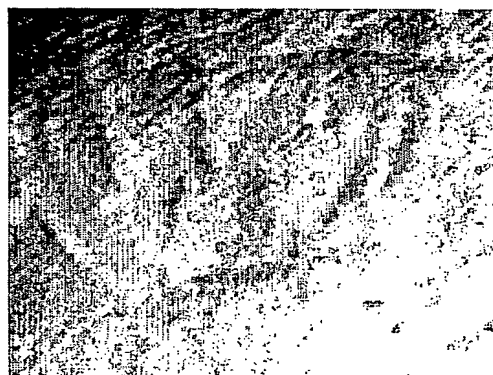
BEST AVAILABLE COPY

10 / 11

A



B



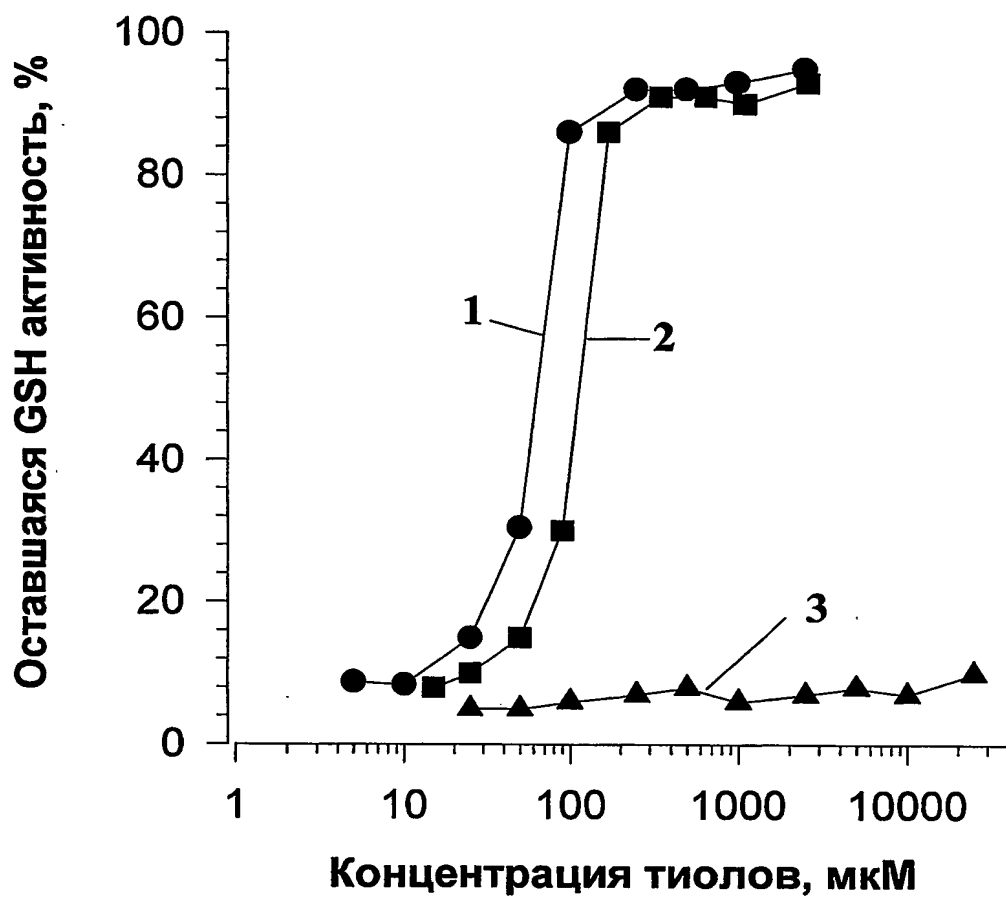
C



Фиг. 10

BEST AVAILABLE COPY

11 / 11



Фиг. 11

Перечень последовательностей

<110> Институт биофизики клетки РАН, Institute of Cell Biophysics RAS

<120> Фармацевтическая композиция с антиоксидантными свойствами, способ получения полипептида и способ лечения.

<130>

<150> RU 2002129774

<151> 2002.11.10

<160> 6

<210> 1

<211> 224

<212> cDNA-mRNA

<213> Homo sapiens

```

<400> cgggtgcttg ctgtcccagc ggcgccccct catcacccgc gcc atg ccc gga ggt ctg 58
                                     Met Pro Gly Gly Leu
                                     1      5
ctt ctc ggg gac gtg gct ccc aac ttt gag gcc aat acc acc gtc ggc 106
Leu Leu Gly Asp Val Ala Pro Asn Phe Gly Ala Asn Thr Thr Val Gly
                                     10      15      20
cgc atc cgt ttc cac gac ttt ctg gga gac tca tgg ggc att ctc ttc 154
Arg Ile Arg Phe His Asp Phe Leu Gly Asp Ser Trp Gly Ile Leu Phe
                                     25      30      35
tcc cac cct cgg gac ttt acc cca gtg tgc acc aca gag ctt ggc aga 202
Ser His Pro Arg Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr Thr Glu Leu Gly Arg
                                     40      45      50
gct gca aag ctg gca cca gaa ttt gcc aag agg aat gtt aag ttg att 250
Ala Ala Lys Leu Ala Pro Glu Phe Ala Lys Arg Asn Val Lys Leu Ile
                                     55      60      65
gcc ctt tca ata gac agt gtt gag gac cat ctt gcc tgg agc aag gat 298
Ala Leu Ser Ile Asp Ser Val Glu Asp His Leu Ala Trp Ser Lys Asp
70      75      80      85
atc aat gct tac aat tgt gaa gag ccc aca gaa aag tta cct ttt ccc 346
Ile Asn Ala Tyr Asn Cys Glu Glu Pro Thr Glu Lys Leu Pro Phe Pro
90      95      100
atc atc gat gat agg aat cgg gag ctt gcc atc ctg ttg ggc atg ctg 394
Ile Ile Asp Asp Arg Asn Arg Glu Leu Ala Ile Leu Leu Gly Met Leu
105      110      115
gat cca gca gag aag gat gaa aag ggc atg cct gtg aca gct cgt gtg 442
Asp Pro Ala Glu Lys Asp Glu Lys Gly Met Pro Val Thr Ala Arg Val
120      125      130

gtg ttt gtt ttt ggt cct gat aag aag ctg aag ctg tct atc ctc tac 490
Val Phe Val Phe Gly Pro Asp Lys Lys Leu Lys Leu Ser Ile Leu Tyr
135      140      145
cca gct acc act ggc agg aac ttt gat gag att ctc agg gta gtc atc 538
Arg Ala Thr Thr Gly Arg Asn Phe Asp Glu Ile Leu Arg Val Val Ile
150      155      160      165
tct ctc cag ctg aca gca gaa aaa agg gtt gcc acc cca gtt gat tgg 586
Ser Leu Gln Leu Thr Ala Glu Lys Arg Val Ala Thr Pro Val Asp Trp
170      175      180
aag gat ggg gat agt gtg atg gtc ctt cca acc atc cct gaa gaa gaa 634
Lys Asp Gly Asp Ser Val Met Val Leu Pro Thr Ile Pro Glu Glu Glu
185      190      195

```

```

gcc aaa aaa ctt ttc ccg aaa gga gtc ttc acc aaa gag ctc cca tct 682
Ala Lys Lys Leu Phe Pro Lys Gly Val Phe Thr Lys Glu Leu Pro Ser
      200      205      210
ggc aag aaa tac ctc cgc tac aca ccc cag cct 715
Gly Lys Lys Tyr Leu Arg Tyr Thr Pro Gln Pro
      215      220

```

<110> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук (Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
Russian Academy of Sciences), Институт биофизики клетки РАН, (Institute of Cell Biophysics
RAS).

<120> Рекомбинантная плазмидная ДНК рЕТ23-а(+)/PrxVIhum 178, кодирующая N-концевой
фрагмент пероксиредоксина VI человека и штамм бактерий *Escherichia coli* I рЕТ23-
а(+)/PrxVIhum 178- продуцент N-концевого фрагмента пероксиредоксина VI человека.

<150> RU 2003123534 (2003.29.07)

<210> 2

<211> 177

<212> cDNA-mRNA

<213> Homo sapiens

```

<400> cgggtgcttg ctgtcccagc ggcgccccct catcacccgc gcc atg ccc gga ggt ctg 58
                                     Met Pro Gly Gly Leu
                                     1      5
ctt ctc ggg gac gtg gct ccc aac ttt gag gcc aat acc acc gtc ggc 106
Leu Leu Gly Asp Val Ala Pro Asn Phe Gly Ala Asn Thr Thr Val Gly
      10      15      20
cgc atc cgt ttc cac gac ttt ctg gga gac tca tgg ggc att ctc ttc 154
Arg Ile Arg Phe His Asp Phe Leu Gly Asp Ser Trp Gly Ile Leu Phe
      25      30      35
tcc cac cct cgg gac ttt acc cca gtg tgc acc aca gag ctt ggc aga 202
Ser His Pro Arg Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr Thr Glu Leu Gly Arg
      40      45      50
gct gca aag ctg gca cca gaa ttt gcc aag agg aat gtt aag ttg att 250
Ala Ala Lys Leu Ala Pro Glu Phe Ala Lys Arg Asn Val Lys Leu Ile
      55      60      65
gcc ctt tca ata gac agt gtt gag gac cat ctt gcc tgg agc aag gat 298
Ala Leu Ser Ile Asp Ser Val Glu Asp His Leu Ala Trp Ser Lys Asp
      70      75      80      85
atc aat gct tac aat tgt gaa gag ccc aca gaa aag tta cct ttt ccc 346
Ile Asn Ala Tyr Asn Cys Glu Glu Pro Thr Glu Lys Leu Pro Phe Pro
      90      95      100
atc atc gat gat agg aat cgg gag ctt gcc atc ctg ttg ggc atg ctg 394
Ile Ile Asp Asp Arg Asn Arg Glu Leu Ala Ile Leu Leu Gly Met Leu
      105      110      115
gat cca gca gag aag gat gaa aag ggc atg cct gtg aca gct cgt gtg 442
Asp Pro Ala Glu Lys Asp Glu Lys Gly Met Pro Val Thr Ala Arg Val
      120      125      130

gtg ttt gtt ttt ggt cct gat aag aag ctg aag ctg tct atc ctc tac 490
Val Phe Val Phe Gly Pro Asp Lys Lys Leu Lys Leu Ser Ile Leu Tyr
      135      140      145

```

cca	gct	acc	act	ggc	agg	aac	ttt	gat	gag	att	ctc	agg	gta	gtc	atc	538
Arg	Ala	Thr	Thr	Gly	Arg	Asn	Phe	Asp	Glu	Ile	Leu	Arg	Val	Val	Ile	
150					155					160					165	

tct	ctc	cag	ctg	aca	gca	gaa	aaa	agg	gtt	gcc	acc					574
Ser	Leu	Gln	Leu	Thr	Ala	Glu	Lys	Arg	Val	Ala	Thr					
				170					175							

<210> 3
 <211> 23
 <212> primer_bind
 <213> Artificial Sequence
 <400> atcaccgtcc atatgccgg agg

<210> 4
 <211> 25
 <212> primer_bind
 <213> Artificial Sequence
 <400> ccagaattct taaggctggg gtgtg

<210> 5
 <211> 27
 <212> primer_bind
 <213> Artificial Sequence
 <400> gcgaaattaa tacgactcac tataggg

<210> 6
 <211> 27
 <212> primer_bind
 <213> Artificial Sequence
 <400> ccatacttcg aattcaactt aggtggc

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/RU 2003/000473

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/43,31/385, C12N 15/52,9/02, A61P 39/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC -7:

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) -7:

A61K 38/43,38/44,31/385, C12N 15/52,9/02, C07K 14/47, A61P 39/06

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 99/09054 A2 (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN) 25.02.1999, the claims, the description pages 8-11	1-7 8-11
Y A	WO 0059899 A (AUGUET MICHEL et al.) 10.12.2000 The claims	1,4-7 8-11
Y	FUJII T et al., Augmented expression of peroxiredoxin VI in rat lung and kidney after birth implies an antioxidative role, Eur J Biochem. 2001 Jan; 268(2):218-24	2,3,8-11
X Y	NCBI SEQUENCE VIEWER, NP 004896, Peroxiredoxin 6; for example J. Biol. Chem. 2001, 276(52) pp 48899-48907	9 8-11
A	WO 02/061063 A1 (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN) 08.08.2002	1,4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 March 2004 (04.03.2004)

Date of mailing of the international search report

25 March 2004 (25.03.2004)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2003/000473

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 38/43,31/385, C12N 15/52,9/02, A61P 39/06

Согласно международной патентной классификации (МПК-7)

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации и индексы) МПК-7:

A61K 38/43,38/44,31/385, C12N 15/52,9/02, C07K 14/47, A61P 39/06

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, поисковые термины):

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y A	WO 99/09054 A2 (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN) 25.02.1999, формула, описание с. 8-11	1-7 8-11
Y A	WO 0059899 A (AUGUET MICHEL et al.) 10.12.2000 формула	1,4-7 8-11
Y	FUJIII T et al., Augmented expression of peroxiredoxin VI in rat lung and kidney after birth implies an antioxidative role, Eur J Biochem. 2001 Jan; 268(2):218-24	2,3,8-11
X Y	NCBI SEQUENCE VIEWER, NP 004896, Peroxiredoxin 6; for example J. Biol. Chem. 2001, 276(52) pp 48899-48907	9 8-11
A	WO 02/061063 A1 (UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN) 08.08.2002	1,4

☐ последующие документы указаны в продолжении графы С.

☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

A документ, определяющий общий уровень техники

E более ранний документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее

O документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета и т.д.

T более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну и изобретательский уровень

Y документ, порочащий изобретательский уровень в сочетании с одним или несколькими документами той же категории

& документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 04 марта 2004 (04.03.2004)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 25 марта 2004 (25.03.2004)

Наименование и адрес Международного поискового органа
Федеральный институт промышленной собственности

Уполномоченное лицо:

С. Мельникова

РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1 Факс: 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Телефон № 240-25-91

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(июль 1998)